

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CARACTERÍSTICAS DA MICROBIOTA DA SUPERFÍCIE OCULAR
BACTERIANA EM ANIMAIS DOMÉSTICOS E SILVESTRES

CURITIBA
2011

LUCIANNE LEIGUE DOS SANTOS

CARACTERÍSTICAS DA MICROBIOTA DA SUPERFÍCIE OCULAR
BACTERIANA EM ANIMAIS DOMÉSTICOS E SILVESTRES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Montiani-Ferreira

CURITIBA
2011

S237 Santos, Lucianne Leigue dos
Características da microbiota da superfície ocular bacteriana
em animais domésticos e silvestres / Lucianne Liegue dos Santos.
– Curitiba, 2011.

76f. : il. (algumas color.) ; 23 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, 2011

Orientador: Fabiano Montiani Ferreira

1.Oftalmologia veterinária. 2. Bacteriologia veterinária.
3. Microbiologia veterinária. I. Ferreira, Fabiano Montiani
II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU 619.77



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada **"CARACTERÍSTICAS DA MICROBIOTA DA SUPERFÍCIE OCULAR EM ANIMAIS DOMÉSTICOS E SILVESTRES"** apresentada pela Mestranda LUCIANNE LEIGUE DOS SANTOS declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09-CEPE/UFPR, que considerou a candidataAPTA..... para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 28 de fevereiro de 2011

Professor Dr. Fabiano Montiani Ferreira
Presidente/Orientador

Dra. Heloisa Helena Abil Russ Giacometti
Membro

Professor Dr. Ivan Roque de Barros Filho
Membro

Dedico esta dissertação aos meus queridos pais, Iramar e Gladdy, e ao meu irmão, Ismar, pelo apoio e incentivo em todas as minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente ao meu Orientador Prof^o Fabiano Montiani Ferreira, pela oportunidade, ajuda, ensinamentos, incentivo, carinho, paciência e por ter sido, além de meu orientador, um super amigo durante esta caminhada.

Aos Prof^o Rogério Lange e Prof^o Ivan Roque de Barros, pela amizade e ajuda na coleta das amostras.

Aos colegas de mestrado Leandro Lima, Suelen Baldotto, Carol Rodarte e Sávia Caline, por toda ajuda durante os experimentos e na confecção desta dissertação.

À MV residente Lenara, sempre enviando amostras para a realização deste trabalho.

Ao pessoal do Laboratório Marcos Enrietti, especialmente a MV Sônia Maria Biesdorf, que muito carinhosamente me recebeu em seu laboratório e me ensinou tantas coisas da bacteriologia veterinária, sem contar a amizade e as tantas horas de trabalho que viraram horas de descontração. Ao MV Gustavo Becker, também do Laboratório Marcos Enrietti, que além da amizade e das conversas “jogadas” fora durante o processamento das amostras, sempre que possível me dava uma ajudinha!

Ao Prof. José Francisco, pois sempre acreditou no meu potencial e quem me viu “engatinhar” na microbiologia.

À Empresa Laborclin, especialmente a MV Karin Viana, que prontamente ajudou com materiais de consumo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFPR e a CAPES, pelo apoio financeiro.

À minha grande amiga Larissa, que além do apoio e amizade, está sempre presente me ajudando em todos os momentos mais importantes da minha vida.

Por fim, mas não menos importante, gostaria de agradecer à minha família e também minhas amigas (*Pate*, *Manu* e *Lu*) por me darem suporte e alegrias para superar todas as pedras no caminho e chegar até aqui.

E aqueles que sem querer eu esqueci,

UM MUITO OBRIGADA!

RESUMO

O termo microbiota é usado para descrever microrganismos que frequentemente são encontrados em várias regiões do corpo em indivíduos saudáveis. Os constituintes e o número desta microbiota são diferentes de acordo com a área e, às vezes, idade e estado fisiológico de cada indivíduo. A superfície ocular é rica em nutrientes e, conseqüentemente, pode albergar diversa variedade de microrganismos, os quais constituirão a microbiota indígena. O estudo da microbiota é importante para uma melhor compreensão dos diferentes microrganismos em locais específicos do corpo e ainda fornece informações sobre as possíveis infecções que possam ser resultados de desequilíbrio desta microbiota. Além disso, o conhecimento da microbiota normal nos casos em que há uma infecção, ajuda os clínicos a terem melhor noção sobre a possível origem e o significado dos microrganismos isolados, além de compreender melhor as causas e conseqüências da colonização ou do crescimento de microrganismos que deveriam estar normalmente ausentes em determinados locais específicos do corpo. Esta dissertação teve por objetivo estudar esta peculiar interação entre microrganismos e a superfície ocular em diferentes espécies animais, tanto domésticas quanto silvestres. O estudo é dividido em três capítulos, sendo o primeiro uma revisão sobre a microbiota ocular, o segundo a descrição das bactérias encontradas na superfície ocular de alguns animais domésticos e silvestres, por fim, o terceiro capítulo, abrange bactérias isoladas a partir de processos infecciosos oculares e especial atenção é dada a uma bactéria específica: *Pseudomonas aeruginosa*. Por apresentar alto potencial patogênico em afecções oculares, conhecer sua sensibilidade *in vitro* a antimicrobianos é de extrema utilidade, desde que a terapia empírica é altamente utilizada, por isso, este capítulo também discute o teste de susceptibilidade a antimicrobianos (TSA) realizado frente às cepas isoladas nesta pesquisa. Além do TSA, essas cepas de *P. aeruginosa* também foram submetidas ao teste para mensurar a concentração inibitória mínima para dois importantes antimicrobianos na oftalmologia: ciprofloxacina e tobramicina. Sabendo que as concentrações dos antibióticos usualmente empregados nos testes disco-difusão para determinar se uma bactéria é sensível ou resistente são baseadas nas potenciais concentrações séricas dos mesmos, e que as concentrações que eles podem atingir na superfície ocular pela aplicação local de colírios são diferentes, torna-se importante o conhecimento da CIM para melhorar avaliar a susceptibilidade antimicrobiana destas cepas oriundas do olho.

Palavras-chaves: bactéria, olho, colonização, oftalmologia, microbiologia

ABSTRACT

The term microbiota is used to describe microorganisms that are frequently found in various body sites in healthy individuals. The constituents and numbers of this microbiota vary in different areas, and sometimes, at different ages and physiologic states. The surface of the eyes is rich in nutrients and, consequently, supports a diverse range of microorganisms that constitute the ocular microbiota or indigenous microbiota. An understanding of the different microorganisms at specific locations provides greater insight into the possible infections that might result from injury to these body sites. Also, knowledge of the normal microbiota in an infected part of the body would help clinicians better understand possible sources and the significance and consequences of colonization or growth by microorganisms normally absent at a specific site. This study aimed to investigate this peculiar interaction between microorganisms and the ocular surface in different animal species, both domestic and wild. This work is divided into three chapters, the first being a review of the ocular microbiota, the second a description of the bacteria found on the ocular surface of some domestic and wild animals, and the third chapter, includes bacteria isolated from infected ocular surfaces and a special attention is given to a particular bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. This bacterium is known as an agent with high pathogenic potential in ocular disorders. Knowledge of *in vitro* sensitivity to antibiotics is extremely useful, since empirical therapy is highly used. This chapter also discusses the antimicrobial susceptibility profile (ASP) of these isolates. Besides the ASP, these strains were also submitted to the minimum inhibitory concentration (MIC) of two important drugs in ophthalmology: ciprofloxacin and tobramycin. Since the status of sensitive or resistant for disc-diffusion tests is given to a bacteria based on the potential serum concentration of antibiotics and the concentration of the same drugs obtained in ocular surface by local application of eye drops are usually higher, it is important to improve our current knowledge of MIC to evaluate the susceptibility of these strains originated from the eye globe.

Key-words: bacteria, eye, colonization, ophthalmology, microbiology

LISTA DE FIGURAS

1. Figura 1 (Capítulo 4): Foto ilustrativa da colheita de material ocular por zaragatoa estéril para cultura bacteriana. Note que a extremidade da zaragatoa encontra-se junto à conjuntiva palpebral e superfície ocular (córnea e conjuntiva bulbar) nos olhos de diferentes animais. O procedimento foi realizado cuidadosamente para evitar contaminação bacteriana externa. Demonstra-se aqui o momento da colheita em diferentes espécies de animais: A) cão; B) carneiro; C) coelho; D) chinchila; E) cavalo; F) sagüi. Notar a presença de uma pinça hemostática empregada na pele palpebral (externamente) para facilitar o acesso do fórnice conjuntival e a utilização de uma microzaragatoa; G) tigre; H) onça; I) leoa; J) morcego. Notar a dificuldade em conter o animal e o tamanho pequeno do bloco ocular, para este animal foi preciso usar uma microzaragatoa; K) jabuti. Notar a falta de luvas de procedimento do assistente e presença de uma pinça hemostática empregada na pele palpebral (externamente). Ambas adaptações foram necessárias para facilitar a contenção e acesso da zaragatoa ao fórnice conjuntival, respectivamente; L) sapo; M) coruja; N) caracará; O) pinguim.....37

2. Figura 1 (Capítulo 5). Foto representativa de alguns dos animais estudados durante este estudo. Todos apresentavam infecção ocular por *P.aeruginosa*. A) Gato diagnosticado com úlcera de córnea com secreção ocular mucopurulenta intensa; B) Olho de um cão após ser submetido ao teste de fluoresceína, antes deste procedimento foi colhido material para exame microbiológico; C) Cão com fístula infra-orbitária e conjuntivite; D) Cavalo com ceratite ulcerativa sendo submetido à colheita de material com zaragatoa estéril; D) Urso-pardo sendo submetido à coleta de material por meio de zaragatoa estéril para exame microbiológico; E) Pinguim-de-magalhães sendo contido manualmente para coleta de material para exame microbiológico.....52

LISTA DE TABELAS

1. Tabela 1 (Capítulo 3): Principais bactérias da microbiota ocular indígena em diferentes espécies animais.....	25
2. Tabela 1 (Capítulo 4): Animais domésticos utilizados neste estudo para descrição da microbiota ocular bacteriana indígena.....	35
3. Tabela 2 (Capítulo 4): Animais silvestres utilizados neste estudo para descrição da microbiota ocular bacteriana indígena.....	35
4. Tabela 3 (Capítulo 4): Resultados encontrados em animais domésticos e silvestres.....	39
5. Tabela 4 (Capítulo 4): Gêneros bacterianos identificados em animais silvestres e domésticos.....	40
6. Tabela 1 (Capítulo 5): Lista dos animais estudados e as doenças oculares diagnosticadas nas quais <i>P. aeruginosa</i> foi isolada.....	51
7. Tabela 2 (Capítulo 5): Bactérias isoladas de olhos de diferentes espécies animais com problemas oftálmicos.....	55
8. Tabela 3 (Capítulo 5): Perfil <i>in vitro</i> de susceptibilidade aos antimicrobianos de cepas de <i>P. aeruginosa</i> isoladas de olhos doentes de diferentes espécies animais.....	56
9. Tabela 4 (Capítulo 5): Concentração inibitória mínima (CIM) de 15 cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de olhos de animais de diferentes espécies.....	57
10. Tabela 5 (Capítulo 5): Resultados da estatística descritiva dos valores encontrados para a concentração inibitória mínima (CIM) para ciprofloxacina e tobramicina das 15 cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de olho doente em diferentes espécies animais.....	57

LISTA DE ABREVIATÖES

µg – Micrograma

ml – Mililitro

mm - Milímetro

°C – Celsius

ASP - *Antimicrobial susceptibility profile*

BGNF – Bacilo Gram-negativo não fermentador

BHI – *Brain Heart Infusion*

CCS – Ceratoconjuntivite seca

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI - *Clinical Laboratory Standards Institute*

H₂S – Ácido sulfídrico

IgA – Imunoglobulina A

KOH – Hidróxido de Potássio

MIC - *Minimum inhibitory concentration*

MV – Médico Veterinário

SCN – *Staphylococcus* coagulase negativo

SCP – *Staphylococcus* coagulase positivo

TSA - teste de susceptibilidade a antimicrobianos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	12
2.1 GERAL	12
2.2 ESPECÍFICOS	12
3. A SUPERFÍCIE OCULAR E A SUA MICROBIOTA – REVISÃO	13
3.1 RESUMO	13
3.2 ABSTRACT	13
3.3 INTRODUÇÃO	14
3.4 HISTÓRICO	15
3.4.1 A descoberta do mundo microbiano e da microbiota	15
3.5 A MICROBIOTA E O OLHO	17
3.5.1 Mecanismo de defesa antimicrobiana ocular	20
3.5.2 Microbiota indígena bacteriana ocular	21
3.5.3 Aquisição/origem da microbiota ocular	22
3.5.4 Composição da microbiota indígena ocular no homem e em diferentes animais	23
3.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
3.7 REFERÊNCIAS	28
4. MICROBIOTA BACTERIANA INDÍGENA DA SUPERFÍCIE OCULAR EM ANIMAIS DOMÉSTICOS E SILVESTRES	31
4.1 RESUMO	31
4.2 ABSTRACT	32
4.3 INTRODUÇÃO	33
4.4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.4.1. Animais utilizados	34
4.4.2. Amostras	36
4.4.3. Processamento das amostras	38
4.4.4. Análise estatística	38
4.5 RESULTADOS	39
4.6 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	41
4.7 REFERÊNCIAS	45
5. SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA E CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE CEPAS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ISOLADAS DE INFECÇÕES OCULARES DE DIFERENTES ESPÉCIES ANIMAIS	47
5.1 RESUMO	47
5.2 ABSTRACT	48
5.3 INTRODUÇÃO	49
5.4 MATERIAL E MÉTODOS	50
5.4.1. Cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas	50
5.4.2. Animais que participaram do estudo	50
5.4.3. Coleta das amostras e processamento	52
5.4.4. Perfil de susceptibilidade a agentes antimicrobianos	53
5.4.5. Concentração inibitória mínima	54
5.4.6. Análise estatística	54
5.5 RESULTADOS	54
5.6 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	58
5.7 REFERÊNCIAS	65
6. ANEXOS	68

1. INTRODUÇÃO:

A conjuntiva é uma estrutura anatômica móvel, semitransparente e tende a ser úmida e brilhante. Reveste a superfície interna das pálpebras, interna e externa da terceira pálpebra e a porção anterior do globo adjacente ao limbo. O espaço coberto pela conjuntiva é denominado de saco conjuntival.

Esta conjuntiva está continuamente exposta a bactérias, fungos e vírus. Nos animais e no ser humano existe uma microbiota bacteriana conjuntival normal. Para correta avaliação das doenças bacterianas da superfície ocular, é necessário conhecer os microrganismos considerados como parte da microbiota.

Vários estudos sobre a microbiota conjuntival em animais domésticos têm sido relatados em diferentes países, entretanto, por influência sazonal, geográfica ou climática, essa microbiota pode ser alterada, sendo sempre interessante do ponto de vista científico uma avaliação da população de cada local.

Para os animais silvestres, principalmente no Brasil, por possuir uma peculiar diversidade faunística, os dados de literatura sobre a microbiota ocular ainda são escassos e mais pesquisas devem ser incitadas neste sentido.

O conhecimento da microbiota do olho é um importante fator no diagnóstico da doença ocular externa devido à diversidade de agentes infecciosos que podem interferir no diagnóstico correto e tratamento efetivo de várias enfermidades oculares.

Entretanto, a origem das infecções quase sempre é exógena e pode ocorrer após procedimentos cirúrgicos, traumas e terapia com agentes imunossupressores. Adicionalmente, no tratamento dos processos infecciosos do bulbo ocular, particularmente da superfície ocular, geralmente há uma destruição da microbiota ocular normal por uso prolongado de

antimicrobianos tópicos, podendo por vezes resultar em um crescimento excessivo de bactérias, leveduras ou fungos, alterando essa microbiota.

A correta identificação do agente etiológico, além de possibilitar um tratamento mais eficiente nas infecções oculares, direciona a antibioticoterapia empírica e também a antibioticoterapia profilática tópica nos casos cirúrgicos consequentemente evita-se o uso abusivo ou errôneo de antibióticos.

Sendo assim, o presente estudo foi desenvolvido na Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias e Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti (CDME), sob convênio estabelecido entre estas duas instituições. Para o desenvolvimento desta pesquisa, a mesma foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias desta Universidade (Anexo I). Participaram deste trabalho 268 animais de diferentes espécies, perfazendo um total de 523 amostras oculares analisadas e dentre estas amostras, 567 bactérias foram identificadas.

Pretende-se, com a análise, discussão e publicação dos resultados deste trabalho, relatar as principais bactérias da superfície ocular de alguns animais domésticos e silvestres, tanto saudáveis quanto doentes, e ainda, destacar a importância da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, agente isolado de olhos de animais e seres humanos e que possui alto potencial patogênico nos tecidos oculares.

O artigo de revisão de literatura em anexo (Anexo II) foi publicado na Medvep Revista Científica de Medicina Veterinária de Pequenos Animais e Animais de Estimação (v. 8, p. 467-473, 2010) e os outros dois capítulos foram apresentados em formato de publicação para a Revista Veterinary Ophthalmology (ISSN 1463-5216).

Este formato de dissertação visa acelerar a divulgação científica dos dados encontrados e permitir que o Comitê de Avaliação contribua com críticas e sugestões tanto na forma quanto ao conteúdo dos trabalhos propostos.

2. OBJETIVOS

•2.1 Geral:

Este trabalho visou caracterizar a microbiota da superfície ocular de uma ampla variedade de animais domésticos e silvestres, oriundos da Região Sul do Brasil, particularmente dos estados de Paraná e Santa Catarina

•2.2 Específicos:

- 1) identificar as bactérias presentes na superfície ocular de animais domésticos, como cães, gatos, cavalos e carneiros clinicamente sadios;
- 2) relatar bactérias encontradas na superfície ocular de animais de diferentes classes (aves, répteis e mamíferos silvestres) sem afecções oculares aparentes;
- 3) identificar bactérias da conjuntiva nos processos oculares infecciosos em animais domésticos e silvestres
- 4) comparar os padrões populacionais de microbiota conjuntival presentes nos animais de diferentes espécies;
- 5) traçar o perfil atual de sensibilidade aos agentes antimicrobianos por meio do teste de disco-difusão para uma importante bactéria isolada em processos infecciosos oculares em espécies silvestres e domésticas (*Pseudomonas aeruginosa*).
- 6) avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) de dois antibióticos (tobramicina e ciprofloxacina) frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de casos clínicos de infecções da superfície ocular em diferentes espécies de animais.

3. A SUPERFÍCIE OCULAR E A SUA MICROBIOTA – REVISÃO

The eye surface and its microbiota – Review

3.1 RESUMO

Microrganismos freqüentemente encontrados em vários locais da superfície corpórea de indivíduos normais e saudáveis são descritos como microbiota indígena. A superfície ocular é rica em nutrientes e, conseqüentemente, muitas bactérias são encontradas, as quais constituem a microbiota ocular comensal. O conhecimento da microbiota normal auxilia o clínico a avaliar melhor certos microrganismos potencialmente patogênicos na superfície ocular e, em casos de lesões oculares, particularmente úlceras de córnea, iniciar medidas preventivas e terapêuticas com maior efetividade. A proposta desta revisão é ajudar a esclarecer a dinâmica interação que existe entre a superfície ocular e a sua microbiota indígena.

Palavras-chave: bactérias, olho, colonização ocular, oftalmologia

3.2 ABSTRACT

The microorganisms that are frequently found in various body sites in normal, healthy individuals are described as indigenous microbiota. The eye surface is rich in nutrients and, consequently, several bacteria are often found, which constitute the commensal ocular microbiota. Knowledge of normal ocular microbiota enables the clinician to evaluate the pathogenic potential of certain organisms on the ocular surface and, in the event of ocular lesions, especially in corneal ulcer, to initiate preventive and therapeutic measures with greater efficiency. The purpose of this review is to help to clarify this dynamic interaction between eye surface and its indigenous microbiota.

Key-words: bacteria, eye, ocular colonization, ophthalmology

3.3 INTRODUÇÃO

Em animais e pessoas saudáveis os tecidos dos órgãos internos são normalmente livres de qualquer tipo de microrganismo. Entretanto, em tecidos superficiais como pele e mucosas, devido ao constante contato com o ambiente e frequente exposição a vários microrganismos, esses tecidos tornam-se rapidamente colonizados por diferentes agentes. A esta população de microrganismos regularmente encontrados em qualquer sítio anatômico chamamos de microbiota normal, microbiota indígena, microflora ou ainda, flora.^(1, 2)

Recentemente tem-se questionado o uso do termo “flora”, uma vez que este termo refere-se mais especificamente às plantas, enquanto que os microrganismos que colonizam os tecidos vivos pertencem a uma classificação diferente daquela que as plantas são enquadradas. Isto se deve a antiga classificação taxômica de Linnaeus, na qual estes microrganismos foram organizados e classificados junto às plantas. Por esta questão semântica, o termo “microbiota” faz-se mais adequado⁽³⁾.

A superfície ocular é rica em nutrientes e conseqüentemente um ambiente favorável à colonização por diferentes microrganismos. A essa população microbiana, frequentemente encontrada na superfície ocular, dá-se o nome então de microbiota indígena ou microbiota ocular normal.

A superfície anterior da esclera e posterior das pálpebras são revestidas por uma fina membrana transparente e protetora denominada conjuntiva. A conjuntiva atua como barreira natural à entrada de microrganismos, seja patogênico ou não, e tem a função de proteção mecânica do bulbo ocular. Trata-se da membrana mucosa mais exposta do organismo e mantém a relação direta com o meio externo⁽⁴⁻⁵⁾.

A conjuntiva pode ser comparada a um nódulo linfático evertido, constituindo-se em um mecanismo de defesa bem desenvolvido que facilita

uma rápida resposta à invasão microbiana. Ainda, a atividade de troca de células, que se dá a cada cinco a sete dias, inibe a invasão de microrganismos que ali residem ⁽⁵⁾.

A microbiota indígena da superfície dos olhos desempenha também um papel na manutenção da sua saúde, prevenindo o desenvolvimento de agentes potencialmente patogênicos ⁽⁶⁻⁷⁾, pois interfere na invasão de microrganismos por privá-los de nutrientes, além de secretar substâncias com propriedades antimicrobianas ⁽⁸⁻⁹⁾.

O presente trabalho tem por objetivo revisar esta interação ecológica e dinâmica entre bactérias e a superfície ocular por elas colonizada.

3.4 HISTÓRICO:

3.4.1 *A descoberta do mundo microbiano e da microbiota*

A visão humana é incapaz de perceber objetos com diâmetro inferior a cerca de 0,1 milímetro. As células vivas estão quase sempre bem abaixo desse limite de tamanho, portanto, os menores organismos, aqueles constituídos de uma só célula, são na maioria, invisíveis a olho nu. Por esta razão, a própria existência do mundo microbiano só foi reconhecida pelo ser humano quando, do progresso da tecnologia científica, resultou a invenção de microscópios ⁽¹⁰⁾.

O holandês Antony van Leeuwenhoek (1632 – 1723), foi um importante personagem na construção de microscópios no início do século XVII, permitindo assim desvendar e explorar cientificamente o reino dos seres “infinitamente” pequenos ⁽¹⁻¹⁰⁾. Entretanto, o lugar de Leeuwenhoek na história científica não se deve tanto a sua habilidade com os microscópios, embora ele tenha sido essencial para o desenvolvimento deste instrumento, mas sim ao extraordinário alcance e à acuidade de suas observações de seres microscópicos.

Esse exímio observador era um cientista atípico, pois era comerciante de tecidos e não tinha uma educação formal e muito menos teve a oportunidade de freqüentar uma universidade, fez observações magníficas sobre estruturas microscópicas de sementes, embriões vegetais, invertebrados; descobriu a existência de espermatozóides e de glóbulos vermelhos mas, o seu maior feito, na qual consolidou sua fama, foi a descoberta do mundo geral dos seres microbianos. Todos os tipos de microrganismo unicelulares (protozoários, algas, fungos e bactérias) foram primeiramente descritos por este holandês ⁽¹⁰⁻¹¹⁾.

Mais ou menos na mesma época em que Leeuwenhoek iniciava suas observações, uma sociedade conhecida como Sociedade Real havia sido estabelecida na Inglaterra, para comunicações e publicações de trabalhos científicos. Apesar de inicialmente esta Sociedade duvidar de seus relatos, mais tarde convidou-o a participar de suas observações aos seus membros e alguns anos após (1680), Leeuwenhoek foi eleito membro. Durante quase cinquenta anos, até sua morte em 1723, Leeuwenhoek transmitiu todas as suas descobertas à Sociedade Real Inglesa na forma de uma longa série de cartas escritas em holandês. Estas cartas foram amplamente traduzidas e publicadas em inglês nos *Proceedings* da Sociedade Real, tornando-se assim rápida e largamente difundida no mundo científico ⁽¹⁰⁻¹¹⁾.

Em setembro de 1683, Leeuwenhoek escreveu à Sociedade Real sobre suas observações referentes a placa bacteriana entre os próprios dentes. Leeuwenhoek ainda repetiu estas observações com duas senhoras e dois homens de idade que nunca tinham limpado os dentes em suas vidas e concluiu que nestes, a quantidade de animálculos (era assim que Antony chamava esses seres minúsculos) era bem maior: “o animálculos foram em número tão grande, que toda a água (saliva) parecia estar viva” ⁽¹¹⁾.

Sendo o pioneiro a descrever estes microrganismos da boca humana, o primeiro relato sobre microbiota humana pode ser a ele atribuído. Ele ainda

salientou a diversidade e a incrível abundância desses seres microscópicos em uma de suas cartas à Sociedade Real⁽¹⁰⁾.

Após Leeuwenhoek ter revelado o vasto mundo microbiano, os cientistas começaram a indagar sobre a origem dessas formas e a microbiologia não progrediu apreciavelmente por mais de um século após sua morte. A principal razão atribuída a esse longo atraso é atribuída a exaustiva discussão que se travou até meados do século XIX sobre biogênese e abiogênese⁽¹⁰⁻¹¹⁾.

Apenas em 1885, com Louis Pasteur, o estudo da microbiota voltou a ser debatida. Pasteur foi o primeiro a perceber a importância desses seres microscópicos colonizando pele e outras partes do organismo. Inclusive, ele sugeriu que os animais não poderiam viver sem estes microrganismos^(12, 1).

A microbiota de conjuntiva de olhos normais foi estabelecida no início do século XIX por Arnold Lawson⁽¹³⁾. Lawson (1867 – 1947) era um médico oftalmologista inglês⁽¹⁴⁾ que em 1898 escreveu um artigo para o *British Medical Journal* relatando que a maioria dos pacientes observados, albergava bactérias em suas conjuntivas saudáveis⁽¹³⁾.

Desde então, muitos relatos sobre a microbiota ocular em seres humanos e em animais surgiram e ainda certamente surgirão. Portanto, não se trata de um assunto que dispense novos e originais estudos, principalmente porque a mesma pode variar de acordo com o ambiente, idade, estado imune e outros fatores ainda desconhecidos.

3.5 A MICROBIOTA E O OLHO:

Numericamente, o corpo humano possui mais de 10^{14} células, destas, 90% não são de origem humana. Estas células “não-humanas” constituem os microrganismos da microbiota comensal^(2, 15; 16).

Algumas propriedades morfológicas, fisiológicas e genéticas destes microrganismos, que veremos a seguir, permitem a colonização e a multiplicação em locais particulares do corpo do hospedeiro, coexistindo com outros microrganismos colonizadores e também inibindo competitivamente outros microrganismos “intrusos”⁽¹⁶⁾. Ocorre uma interação dinâmica e uma relação de simbiose, na qual ambos são beneficiados, hospedeiro e microrganismos ⁽¹⁾.

Nos indivíduos saudáveis estes microrganismos são encontrados frequentemente em diferentes partes do corpo. Os constituintes e o número desta microbiota variam em diferentes áreas e algumas vezes diferente idade e estado fisiológico de um indivíduo ⁽¹⁷⁾.

Nem todos os microrganismos encontram um ambiente favorável ao colonizar um hospedeiro. Alguns falham em estabelecer uma interação e outros podem colonizar por períodos variáveis ⁽¹⁵⁾. Por isso, essa microbiota pode ser classificada em: microrganismos residentes, transitórios e patogênicos^(17,2).

A microbiota do saco conjuntival também possui organismos residentes, transitórios e patogênicos oportunistas. A microbiota residente consiste em microrganismos não invasivos, que conseguem se estabelecer por um período longo e indefinido. Eles são considerados habitantes normais da conjuntiva e córnea e podem ser isolados em amostras vindas de superfície ocular em elevado número⁽¹⁸⁻¹⁹⁾.

Os agentes que têm permanência temporária na superfície ocular e não conseguem estabelecer uma colonização efetiva, seja por competição com outros organismos ou por não conseguir superar o sistema de defesa do hospedeiro, são classificados como transitórios. Geralmente esses microrganismos são adquiridos do meio ambiente que cerca o hospedeiro ^(15, 17). Para classificar em residentes ou transitórios os microrganismos da

conjuntiva, aconselha-se acompanhar um indivíduo fazendo várias culturas, em diferentes períodos.

Apesar da maioria dos agentes da microbiota não causarem danos ao hospedeiro, alguns são capazes de induzir o aparecimento de processos infecciosos. Estes processos são desencadeados, na grande parte, por um desequilíbrio entre o hospedeiro e o agente infeccioso, ou seja, em uma oportunidade especial de fraqueza, estresse, lesão ou ineficiência do sistema imune do hospedeiro^(2, 15).

A maioria dos organismos da microbiota conjuntival não é considerada patogênica desde que haja a integridade da conjuntiva e do epitélio corneano. Se ocorrer a quebra da barreira de proteção da superfície ocular, como uma abrasão corneano, microrganismos residentes e transitórios podem infiltrar no estroma corneano e resultar em uma úlcera de córnea⁽²⁰⁾ ou ainda, em casos de lesão da conjuntiva, causar uma conjuntivite bacteriana.

A microbiota indígena da superfície ocular desempenha um papel fundamental na manutenção da sua saúde, prevenindo o desenvolvimento de agentes potencialmente patogênicos⁽⁶⁾, pois interfere na invasão de microrganismos por privá-los de nutrientes, além de secretar substâncias com propriedades antimicrobianas⁽⁸⁻⁹⁾.

Existem muitas razões para se conhecer e entender a microbiota indígena. O entendimento dos diferentes microrganismos que normalmente aparecem em locais específicos do corpo, oferece subsídios ao clínico para entender melhor as possíveis infecções que podem resultar da lesão destes locais; o conhecimento da microbiota normal em uma área infectada do corpo, ajuda a descobrir a possível fonte da infecção e a significância deste microrganismo isolado; ainda, o conhecimento desta microbiota comensal cria uma melhor perspectiva para entender as causas e conseqüências da colonização e o crescimento de microrganismos atípicos em determinadas áreas do corpo⁽¹⁾.

Portanto, conhecer a microbiota ocular indígena ajuda ao clínico avaliar o potencial patogênico de certos agentes encontrados na superfície do olho e, em eventos de lesão ocular, iniciar medidas racionais, preventivas e terapêuticas com maior precisão.

3.5.1 *Mecanismo de defesa antimicrobiana ocular:*

Os olhos possuem mecanismos de proteção contra agressões químicas e físicas. As pálpebras constituem um importante componente físico de defesa ocular. O reflexo de piscar protege a superfície do olho contra corpos estranhos e possíveis microrganismos. Enquanto a pálpebra move-se regularmente sobre a córnea, ajuda na remoção de partículas estranhas, restos celulares e também bactérias⁽⁷⁾.

As glândulas lacrimais secretam as lágrimas que deixam a conjuntiva hidratada. Além disso, a lágrima fornece uma proteção química muito importante, pois contém substâncias bactericidas, como a lisozima, lactoferrina, fosfolipases e imunoglobulinas (IgA)^(1,7).

O epitélio conjuntival alberga inúmeras células secretoras de mucina, linfócitos intraepiteliais e células dendríticas. Consiste entre cinco a sete camadas de células, promovendo uma barreira bastante efetiva contra invasão bacteriana, sendo pouquíssimos microrganismos capazes de infectar tecidos mais profundos do olho, a não ser que esta barreira seja danificada⁽⁷⁾. Além disso, ocorre uma constante renovação destas células (cada cinco a sete dias), inibindo a invasão de microrganismos que ali residem⁽⁵⁾.

Os próprios microrganismos da microbiota, associados aos fatores humorais da superfície ocular, contribuem com a modulação de sua defesa, restringindo o aparecimento de organismos patogênicos⁽²¹⁾.

Com a mudança das condições normais da superfície ocular, microrganismos, com seus fatores de virulência, parecem ficar mais

resistentes e as defesas naturais mais vulneráveis, aumentando a capacidade infecciosa destes agentes. Para que a infecção ocular se instale é necessário aderência, penetração, invasão, persistência e multiplicação do microrganismo, independente dos mecanismos de defesas existentes. A capacidade de invasão microbiana decorre da capacidade de produção de exotoxinas, proteases e endotoxinas que destroem células e tecidos oculares⁽²²⁾.

Sendo assim, a conjuntiva é um ambiente bastante inóspito e poucos microrganismos têm a oportunidade de colonizá-la sem um mecanismo especial de adesão à superfície ocular, habilidade de suportar a ação da lisozima ou sobreviver aos outros componentes antimicrobianos.

Consequentemente, a conjuntiva de muitos indivíduos é estéril ou possui uma esparsa população microbiana ⁽²⁾.

3.5.2 *Microbiota indígena bacteriana ocular:*

Dos poucos microrganismos isolados da superfície ocular, a maioria é composta por bactérias aeróbicas, sendo as bactérias do tipo anaeróbicas e alguns fungos pouco predominantes ⁽¹⁾.

Têm-se debatido continuamente se os microrganismos detectados na superfície dos olhos constituem a microbiota residente ou são meramente transitórios. Duas justificativas que parecem apoiar a última hipótese é que: (1) amostras da conjuntiva de muitos indivíduos saudáveis não albergam nenhum microrganismo cultivável; e (2), os microrganismos que podem ser cultivados são usualmente típicos daqueles encontrados na pele⁽⁷⁾.

Entretanto, devem-se considerar alguns fatores que podem afetar o resultado de culturas oculares negativas como⁽²¹⁾: amostra de material pequena; cultivo em meios inadequados (como ágar gelado, pouco ágar ou com prazo de validade vencido); transporte e armazenagem inadequados e

uso de colírios anestésicos com preservativos, que tem ação antibactericida, diminuindo o crescimento.

Diferentes locais anatômicos do olho também parecem influenciar na qualidade e quantidade dos microrganismos isolados. AYOUB et al. (1994)⁽²³⁾ sugerem que o canto nasal do olho é o local mais contaminado do olho, seguido pelo fórnice inferior e depois fórnice superior (local onde se obtém menor crescimento bacteriano).

3.5.3 *Aquisição/origem da microbiota ocular:*

O feto saudável é estéril e logo após a ruptura da membrana durante o nascimento, o processo de colonização microbiana se inicia⁽²⁾.

O recém-nascido é exposto à microbiota do trato vaginal da mãe, à microbiota da pele e trato respiratório de quem o manipula e aos microrganismos do ambiente. Após ter sido exposto a uma grande variedade de organismos, aqueles melhores adaptados a colonização em sítios anatômicos particulares tornam-se predominantes⁽¹⁷⁾.

A conjuntiva e a pálpebra são estéreis antes do nascimento, pois o saco amniótico protege o feto e oferece uma ambiente sem microrganismos. A aquisição da microbiota ocular também é iniciada durante o nascimento, pela passagem do feto pelo canal cervical no momento do parto⁽²¹⁾ e continua, muitas vezes variando, durante toda a vida⁽²⁴⁻²⁵⁾.

A natureza do microbiota ocular nos neonatos é altamente afetada pela forma de nascimento (parto normal ou cesárea). A microbiota da conjuntiva dos nascidos por cesárea é menor e os membros geralmente são espécies de microrganismos encontrados na pele, dominando propionibactérias e corinebactérias. Na conjuntiva dos recém-nascidos por parto normal, gêneros do tipo *Lactobacillus* e bifidobactérias dominam⁽⁷⁾.

Como a presença da microbiota normal implica proteção contra organismos patogênicos, o nascimento por cesárea pode ser importante numa maior chance de desenvolver processos infecciosos. Entretanto, deve-se considerar também uma mãe colonizada por agentes potencialmente patogênicos e que causam conjuntivite, e quando o neonato nasce por parto normal, ele pode ser mais susceptível⁽⁷⁾.

Desde então, a microbiota conjuntival vai ser composta principalmente por agentes da pele e trato respiratório superior e se manterão relativamente constantes durante toda a vida^(6,26). Vale lembrar que em algumas situações um determinado organismo da microbiota normal pode multiplicar-se e tornar-se patogênico.

3.5.4 Composição da microbiota indígena ocular no homem e em diferentes animais:

De acordo com RYAN (2004)⁽¹⁷⁾, condições fisiológicas locais e ecológicas determinam a natureza da microbiota. Estas condições são na maioria das vezes, muito complexas, diferindo de local para local. Fatores como o ambiente, idade, estação do ano, resposta imune e condições gerais de higiene sugerem possíveis variáveis na composição da microbiota indígena ocular⁽²⁷⁾.

Apesar da superfície ocular ser rica em nutrientes e um pequeno número de microrganismos serem encontrados como comensais na superfície do olho (basicamente bactérias), uma variedade de gêneros bacterianos podem ser cultivados da conjuntiva e poucos fungos⁽¹⁻²⁾.

De uma forma geral, os gêneros mais freqüentemente isolados são: estafilococos, estreptococos e corineformes^(1, 28, 7, 2). Esta característica não é exclusiva apenas dos seres humanos, pois muitos animais compartilham uma microbiota ocular indígena semelhante.

Muitos trabalhos com animais de espécies bastante distintas como: furão doméstico ⁽²⁹⁾, macaco-prego⁽³⁰⁾, cães⁽²⁸⁾, carneiros⁽³¹⁾, cavalos⁽²⁰⁾, capivaras⁽³²⁾, camelos⁽³³⁾, veados⁽³⁴⁾ e centenas de outras espécies têm demonstrado a soberania da colonização conjuntival por bactérias Gram-positivas. Até em animais de hábitos aquáticos, como os castores, a microbiota ocular é composta principalmente por Gram-positivas⁽³⁵⁾. A Tabela 1 lista mais detalhadamente a microbiota indígena ocular de diferentes espécies animais.

Tabela 1. Principais bactérias da microbiota ocular indígena em diferentes espécies animais

Cão ^(28, 36)	Grande variação na prevalência de organismos Gram-positivos são os isolados mais comuns e o gênero <i>Staphylococcus</i> é o mais predominante Bactérias isoladas de 68 a 78% de olhos de cães normais
Gato ³⁶	Mais de 65% podem ser culturas negativas <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>S. epidermidis</i> predominam
Furão-europeu ²⁹ <i>Mustela putorius</i> <i>Furo</i>	Apenas 20% dos animais albergam alguma bactéria na conjuntiva Gram negativa não é comum da conjuntiva Dois gêneros prevalecem: <i>Staphylococcus</i> sp. e <i>Corynebacterium</i> sp.
Coelho ³⁶	<i>Bacillus</i> sp. e <i>Staphylococcus</i> sp.: principais agentes isolados <i>Pasteurella multocida</i> e <i>Bordetella bronchiseptica</i> : pode ser infrequente
Cavalo ^(20, 36)	Bactérias Gram positivas aeróbicas predominam <i>S. epidermidis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Corynebacterium</i> sp. e <i>Streptomyces</i> são os Gram positivos mais comuns Gram negativos também encontrados: <i>Moraxella</i> , <i>Neisseria</i> e <i>Acinetobacter</i>
Boi ³⁶	<i>Moraxella bovis</i> não hemolítica, <i>S. epidermidis</i> , <i>Brahmella catarrhalis</i> , <i>Mycoplasma</i> spp., <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus</i> spp.
Carneiro ^{31, 36}	<i>Brahmella ovis</i> é um dos agentes mais comum outros isolados: <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Streptococcus</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp. <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Bacillus</i> sp.
Veado ³⁴ <i>Mazama</i> <i>Gouazoubira</i>	Bactérias mais comuns: <i>Bacillus</i> sp. e <i>Diplococcus</i> sp. <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp. e bacilos Gram negativos também são isolados comuns Pode haver variabilidade bacteriana de acordo com a estação sazonal
Camelo ^{33, 36}	Isolados frequentes: <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Bacillus</i> sp. e <i>Pseudomonas</i> sp. Muitos dos agentes são patógenos em potenciais
Capivara ³² <i>Hydrochaerys</i> <i>Hydrochaerys</i>	<i>Corynebacterium</i> sp. gênero mais comumente encontrado Outros gêneros incluem: <i>Micrococcus</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Staphylococcus</i> sp..
Castor ³⁵ <i>Castor canadensis</i>	<i>Micrococcus</i> spp. é o isolado mais comum Outros: cocobacilos Gram positivos, <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Streptococcus</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp, <i>Clostridium sordelli</i> , e <i>Peptostreptococcus</i> spp.
Macaco-prego ³⁰ <i>Cebus apella</i>	<i>Streptococcus</i> sp. e <i>Corynebacterium</i> sp. de conjuntiva saudável e margem palpebral foram os gêneros mais isolados
Aves ³⁶	Conjuntiva de aves exóticas em cativeiro: 70% Gram positivas Gêneros mais comuns em aves exóticas e psitacídeos <i>Staphylococcus</i> sp. e <i>Corynebacterium</i> sp.

Estas bactérias parecem ser produtoras de bacteriocinas que impedem a colonização por bactérias distintas das já citadas. De qualquer forma, a regra para esta antagonização de componentes em manter uma comunidade microbiana ainda precisa ser melhor investigada⁽⁷⁾.

A principal fonte das bactérias que compõem a microbiota ocular basicamente são os mesmos microrganismos presentes na pele e no trato respiratório. Nos seres humanos bactérias do tipo *Propionibacterium* são comumente classificadas como bactérias de microbiota da pele, entretanto elas também podem fazer parte da microbiota ocular^(37, 7). Em animais isto também parece ser aplicado. Em cães, um dos principais agentes encontrados na microbiota conjuntival é o *Staphylococcus pseudintermedius* (anteriormente referenciado como *S. intermedius* ^[38]^(28, 39), uma bactéria típica da microbiota de pele do cão⁽⁴⁰⁾.

Nos indivíduos livres de doença ocular, a microbiota normal do olho direito e esquerdo são similares e em geral, um número limitado de espécies estão presentes – geralmente menos de três espécies diferentes de bactérias⁽⁷⁾.

Em animais, diversos trabalhos também têm demonstrado esse número pequeno de espécies bacterianas na superfície ocular^(30, 35). A superfície ocular das capivaras demonstrou esse número limitado de diferentes espécies bacterianas ⁽³¹⁾. Dos 34 olhos analisados, 19 tiveram crescimento para apenas um gênero bacteriano, nove olhos com dois gêneros bacterianos e seis olhos com três gêneros. Em furões, dos 30 olhos estudados, apenas seis albergavam alguma bactéria e destas, apenas dois gêneros foram identificados: *Staphylococcus* sp. e *Corynebacterium* sp.⁽²⁹⁾.

A maioria dos estudos apenas cita os microrganismos identificados pelo método clássico de isolamento e identificação, com a evolução e a praticidade das ferramentas da biologia molecular para estudar a biodiversidade microbiana, certamente haverá cada vez mais trabalhos nesta área e talvez novos

microrganismos não cultiváveis pelos métodos tradicionais serão ainda identificados.

3.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS:

A interação entre os microrganismos e o homem/animais é um assunto que sempre despertou grande interesse e a compreensão desta inusitada associação é particularmente importante em processos patológicos tais como as ceratites ulcerativas. As bactérias Gram-positivas são freqüentemente isoladas em pequenos números da superfície ocular da maioria dos mamíferos já estudados. Trata-se de um fato importante de ser lembrado quando os resultados das culturas da superfície ocular são avaliados. A conjuntivite bacteriana é mais comumente o resultado de um fator predisponente que permite o crescimento excessivo de bactérias indígenas ou invasoras, como ocorre na ceratoconjuntivite seca. A diversidade dos microrganismos encontrados na microbiota ocular de cada espécie animal e os eventuais processos infecciosos que estes agentes podem causar, torna este assunto de grande valia, principalmente quando se faz necessário entender os mecanismos de instalação e progressão da doença causada por agentes da microbiota, bem como estabelecer prognósticos mais precisos e protocolos terapêuticos mais eficazes.

3.7 REFERÊNCIAS

1. PRESCOTT, L M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D.A. Microbiology Fifth Edition. The Macgraw-Hill Companies, 2002, p.2.
2. TODAR, K. "The Normal Bacterial Flora of Humans", 2006. Disponível em: <http://www.textbookofbacteriology.net/normalflora.html> > Acesso em: 22/10/2009.
3. TORTORA, G. J., CASE, C.L., FUNKE, B. R. "Microbiology: an introduction". 10th Benjamin Cummings, 2010.
4. SAMUELSON, D. A. Ophthalmic anatomy. In: GELLAT, K.N. Veterinary Ophthalmology, 3^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 1999, p. 31-150.
5. SLATTER, Fundamentals of veterinary ophthalmology. 3^a ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2001, 640 p.
6. DAVIDSON., H.J.; ROGERS D.P.; YEARY, T.J.. Conjunctival microbial flora of clinically normal pigs. Am J Vet Res 1994; 55: 949–951.
7. WILSON, M. Eye and Its Indigenous Microbiota. In: Microbial Inhabitants of Humans – Their Ecology and Role in Health and Disease. Cambridge University Press, 2005. Cap 3, p107-126.
8. HSU, C.; WISEMAN, G.M. Antibacterial substances from staphylococci. Can J Microbiol 1967, 13:947-55.
9. FREDRICKSON, AG. Behavior of mixed cultures of microorganisms. Ann Rev Microbiol, 1977;31:63-87.
10. STANIER, R.Y.; DOUDOROFF, M.; ADELBERG, E.A. Mundo dos Micróbios. São Paulo: Edgard Blucher e USP, 1969, p30-35..
11. MOLL, W. "Antonie van Leeuwenhoek, 2006. Disponível em: <http://www.euronet.nl/users/warnar/leeuwenhoek.html> > Acesso em: 26/10/2009.
12. WOSTMANN, B.S. Germfree and Gnotobiotic Animal Models Background and Applications. CRC Press, 1996, Inc.: Boca Raton, FL. Cap 1, p38.
13. LAWSON, A. The bacteriology of the normal conjunctival sac and its practical bearing on the utility of antiseptics in ophthalmic surgery. SIXTY-SIXTH ANNUAL MEETING OF THE BRITISH MEDICAL ASSOCIATION, July, 1898, Edimburgo, Escócia. Proceedings Br Med J, 1898: 2, 486-487.
14. ANÔNIMO. Obituário de Arnold Lawson em Br J Ophthalmol. 1947, 31(4): 251–253. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC510737/?page=1> > Acesso em 17/12/2009.
15. HERITAGE, J.; EVANS, E.G.V.; KETTINGTON, R.A. The human commensal flora. In: Microbiology in Action. Cambridge University Press, 2003, Cap 6., 121-130.

16. VERSIGNASSI, A.; AXT, B.. Donos do Mundo. Super Interessante, Ed. 268, p.52-60, Ago, 2009.
17. RYAN, K. Normal Microbial Flora. In: RYAN, K.; RAY, G. Sherris Medical Microbiology – “An Introduction to Infectious Diseases”. The Macgraw-Hill Companies, 2004. Cap. IX, p.141-147.
18. GERDING, P.A., KAKOMA, I. Microbiology of the canine and feline eye. Vet Clin North Am: Small An Practice, 1990. 20, 615-625.
19. WANG, L.; PAN, Q.; ZHANG, Q. X.; CUI, J.; QI, C.. Investigation of bacteria microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Beijing, China. Vet Ophthamol, v. 11, n. 3, p.145-149 ,2008.
20. ANDREW, S.E.; NGUYEN, A.; JONES, G.L.; BROOKS, D.E. Seasonal effects on the aerobic bacterial and fungal conjunctival flora of normal thoroughbred brood mares in Florida. Vet Ophthamol, 2003, 6 (1),45–50..
21. UESUGUI, E; CYPEL-GOMES, M.C.; ATIQUE, D.; GOULART, D.G.; GALLUCCI, F.R.; NISHIWAKI-DANTAS et al. Identificação laboratorial dos patógenos oculares mais freqüentes e sua suscetibilidade in vitro aos agentes antimicrobianos. Arq. Bras. Oftalmol. 2002; 65(3): 339-342.
22. VIEIRA, L.A.; LIMA, A.L.H.; CUNHA, M.; MASCARO, V. Conceitos básicos e clínicos de doenças externas e córnea. In: Doenças externas oculares e da córnea. Rio de Janeiro: Cultura Médica, p. 13-15, 1999.
23. AYOUB, M.; BADR, A.; ELIAN, S.. A study on the effect of antibodies on the normal flora of the eye. Med J Cairo University, 1994, 62,(1),121-128.
24. ISENBERG, S.J.; APT, L.; YOSHIMORI, R.; ALVAREZ, S.R.. Bacterial flora of the conjunctiva at birth. J Ped Ophthalmol & Strabismus, 1994, 23, 284-286.
25. THIEL, H.J.; SCHUMACHER, U.. Normal flora of the human conjunctiva: examination of 135 of various age. Klin Monabl Augenheilkd, 1994, 205, 348-357.
26. GASKIN, J.M. Microbiology of the canine and feline eye. Vet Clin North Am: Small An Practice, 1980;10, 303-16.
27. GUNDUZ, A.; GUNDUZ, A.; TONGABAY, C.; SEYREK, A.. Conjunctival flora in Behcet patients. Can J Ophthalmol, 2008, 43, (4), 476-479.
28. PRADO, M. R.; ROCHA, M.F.G.; BRITO, E.H.S.; GIRÃO, M.D; MONTERIO, A.J.; TEIXEIRA, M.F.S; et al.. Survey of bacterial microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Fortaleza, Ceara, Brazil. Vet Ophthalmol, 2005, 8 (1), 33-37..
29. MONTIANI-FERREIRA, F., MATTOS, B.C.; RUSS, H. H.A. Reference values for selected ophthalmic diagnostic tests of the ferret (*Mustela putorius furo*). Vet Ophthalmol 2006, 9 (4), 209-213.

30. MONTIANI-FERREIRA, F., SHAW, G., MATTOS, B.C.; RUSS, H. H.A., VILANI, R.G D'O.C. Reference values for selected ophthalmic diagnostic tests of the capuchin monkey (*Cebus apella*) Vet Ophthalmol 2008, 11(3) 197-201..
31. ALMEIDA NETO, J.B., SÁ, F. B.; SILVA, K.P.C.; BUZINHANI, M. Flora conjuntival bacteriana de ovinos sadios da raça Sta Inês e seus mestiços criados na microrregião de Garanhuns, PE. Ciencia Vet Trop, janeiro/abril, 2006, 9, (1), 17 – 22.
32. MONTIANI-FERREIRA, F., TRUPPEL, J.; TRAMONTIM, M. H.; VILANI, R.G; LANGE, R.R. The capybara eyes: clinical tests, anatomic and biometric features. Vet Ophthalmol 2008, 11(6) 386-394.
33. FAHMY, L.S.; HEGAZY, A.A.; ABDELHAMID, M.A.A; HATEM, M.E.; SHAMAA, A.A. Studies on eyes affections among camels in Egypt: clinical and bacteriological studies. Sci J King Faisal Univer, 2003, 4(2):159-176.
34. MARTINS, B.C.; ORIÁ, A.P.; SOUZA, A.L.G.; CAMPOS, C.F.; ALMEIDA, D.E.; DUARTE, R.A. et al, Ophthalmic patterns of captive brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). J Zoo Wild Med, 2007, 38 (4), 526-532.
35. CULLEN, C.L. Normal ocular features, conjuntival microflora and intraocular pressure in the Canadian Beaver (*Castor canadensis*). Vet Ophthalmol, 2003, 6 (4), 279-284.
36. MOORE, C.P.; NAISSE, M.P.. Clinical Microbiology. In: GELLAT, K.N. Veterinary Ophthalmology, 3^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 1999, p. 270.
37. SINGER, T.R.; ISENBERG, S.J.; APT, L. Conjunctival anaerobic and aerobic bacterial flora in paediatric versus adult subjects. Br J Ophthalmol, 1998, 72, p. 448-451.
38. DEVRIESE, L .A.; VANCANNEYT, M.; BAELE, M. VANEECHOUTTE, M. GRAEF,E.; SANUWAERT, C.; et al. *Staphylococcus intermedius* sp. nov., a coagulase positive species from animals. Int J Syst Environ Microbiol, 2005, 55, 4, 1569-1573.
39. VARGES, R., PENNA, B.; MARTINS, G.; MARTINS, R., LILENBAUM, W. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococci* isolated from naturally occurring canine external ocular diseases. Vet Ophthalmol 2009, v. 12, n. 4, p.216-220.
40. IHRKE, P.J. Therapeutic strategies involving antimicrobial treatment of the skin in small animals. J Am Med Assoc, 1984, 185, 10, 1165-1168.

4. MICROBIOTA BACTERIANA INDÍGENA DA SUPERFÍCIE OCULAR EM ANIMAIS DOMÉSTICOS E SILVESTRES

Indigenous bacterial microbiota of eye surfaces from domestic and wild animals

4.1 RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar a microbiota bacteriana da superfície ocular em diferentes espécies animais. Foram usados 199 indivíduos de 13 diferentes espécies de animais silvestres e domésticos, sem doença ocular, advindos de um hospital veterinário universitário e de diferentes zoológicos da região Sul do Brasil. As zaragatoas foram gentilmente friccionadas na superfície ocular de cada indivíduo, mantidas em meio de transporte, refrigeradas e submetidas ao laboratório para identificação. Das 396 amostras, 276 tiveram crescimento bacteriano. Destas amostras, 21 gêneros diferentes de bactéria foram identificados. As bactérias do tipo Gram-positivas foram significativamente mais prevalentes (81%) do que as Gram-negativas (19%). O gênero *Staphylococcus* sp. foi o mais prevalente (39,6%) seguido por *Streptococcus* sp. (15,2%), *Bacillus* sp. (11,9%) e *Corynebacterium* sp. (8,6%). As Gram-negativas mais isoladas foram da família Enterobacteriaceae e a bactéria *Escherichia coli* (7,9%) foi o agente mais isolado neste grupo. Este trabalho demonstrou algumas similaridades com estudos prévios realizados em seres humanos e outros animais sobre a microbiota ocular.

Palavras-chave: bactérias, superfície ocular, flora, oftalmologia, microbiologia.

4.2 ABSTRACT

The objective of this study was to determine normal bacterial ocular surface microbiota from 13 different species of wild and domestic animals. One hundred ninety nine individuals (n=199) without signs of ocular disease were selected for this study. The animals used in this investigation originated from a veterinary teaching hospital and from different zoos located at the South region of Brazil. Samples were collected by gently touching the ocular surface of healthy eyes with a swab, then kept in a transport medium, refrigerated and submitted to the laboratory in order to identify the resident bacterial microbiota. From the 396 samples, 276 were positive for bacterial growth. In fact, 21 different genera of bacteria were identified. Gram-positive (81%) were significantly more prevalent than Gram-negative bacteria (19%). *Staphylococcus* sp. was the most prevalent genus (39.6%) followed by *Streptococcus* sp. (15.2%), *Bacillus* sp. (11.9%) and *Corynebacterium* sp. (8.6%). The most common Gram-negative bacteria found in this investigation belonged to the Enterobacteriaceae family, with *Escherichia coli* (7.9%) being the main species isolated. This survey demonstrated some similarities to previous studies carried out in human beings and other animal species, regarding the bacteria isolates from healthy eyes.

Key-words: bacteria, eye surface, flora, ophthalmology, microbiology

4.3 INTRODUÇÃO

A superfície do olho é rica em nutrientes e, conseqüentemente, muitos microrganismos podem ser encontrados, constituindo a denominada microbiota normal ocular¹. A população bacteriana conjuntival normal tem sido estudada em diferentes espécies animais, como porcos², cães^{3,4}, gatos⁵, cavalos⁶, bois⁷, carneiros⁸, coelhos⁹, aves¹⁰, veados¹¹, castores¹², furão-europeu¹³, macaco-prego¹⁴ entre outras espécies.

A microbiota da conjuntiva pode ser dividida em organismos residentes e organismos transitórios. A microbiota residente consiste em microrganismos não invasivos que são considerados habitantes normais da conjuntiva e da córnea. Eles podem ser isolados em amostras vindas de superfície ocular em elevado número^{15, 4}.

Esta microbiota normal da superfície ocular desempenha papel crucial na manutenção da sua saúde, prevenindo o desenvolvimento de agentes potencialmente patogênicos², pois interfere na invasão de microrganismos por privá-los de nutrientes, além de secretar substâncias com propriedades antimicrobianas^{16,17}. A maioria das bactérias da microbiota conjuntival não é considerada patogênica desde que haja integridade do epitélio corneano. Se ocorrer quebra da barreira de proteção da superfície ocular, como no caso de ocorrer uma abrasão corneana, microrganismos residentes e transitórios podem infiltrar no estroma corneano e resultar em uma ceratite ulcerativa de córnea⁶.

O equilíbrio entre hospedeiro, microbiota normal e microrganismos patogênicos existe devido à defesa inata e adquirida da lágrima e sistema imune. Qualquer um destes mecanismos de defesa pode falhar, permitindo que um patógeno se desenvolva¹⁸.

O conhecimento da microbiota normal é um parâmetro muito importante para o conhecimento dos clínicos quando ocorrem doenças oculares externas. Estes dados auxiliam na melhor conduta de possíveis tratamentos quando processos infecciosos estão presentes.

Com intuito de contribuir para o conhecimento da clínica médica oftálmica veterinária, particularmente para a oftalmologia de animais silvestres, este trabalho teve o objetivo de descrever a microbiota bacteriana ocular normal de diferentes espécies animais advindos da cidade de Curitiba e alguns animais de zoológico do estado do Paraná e de Santa Catarina.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1) Animais utilizados

Participaram deste estudo cento e noventa e nove animais ($n = 199$) sem sinais clínicos de doença ocular ou sistêmica, baseados nos dados da anamnese, exame físico e exame oftálmico. Os olhos de todos os animais foram examinados, pela mesma equipe de investigadores, mediante autorização prévia, como parte do exame físico completo rotineiramente realizado por diferentes veterinários responsáveis por cada uma das instituições participantes da investigação. Os animais foram divididos em dois grupos: a) animais domésticos (cães, carneiros, cavalos, chinchilas e coelhos) (Tabela 1) e b) silvestres (grandes felídeos [tigre, leoa, ligre], primatas não-humanos [sagüis], morcegos [hematófagos e frugívoros], aves [coruja-orelhuda, caracará e pingüim-de-magalhães], anfíbios [sapo] e répteis [jabuti-prianga]) (Tabela 2). Os animais que participaram deste estudo ou eram de propriedade privada ou pertenciam a diferentes instituições mantenedoras de animais silvestres do estado do Paraná, tais como Museu Capão da Imbuía, Museu de Ciências Naturais - UFPR, Passeio Público, Cetas-PUC, Parque das Aves, Refúgio Biológico Bella Vista da Itaipu Binacional e do estado de Santa Catarina, como o Zôo de Pomerode e Parque Beto Carreiro.

Tabela 1: Animais domésticos utilizados neste estudo para descrição da microbiota ocular bacteriana indígena

Animal	Espécie	n° de animais	N° de amostras
ANIMAIS DOMÉSTICOS			
Coelho	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	47	94
Chinchila	<i>Chinchilla lanígera</i>	17	34
Cão	<i>Canis lupus familiaris</i> (raça Beagle)	11	22
Carneiro	<i>Ovis áries</i> (raça Dorper)	15	30
Cavalo	<i>Equus caballus</i>	10	20
TOTAL		100	200

Tabela 2: Animais silvestres utilizados neste estudo para descrição da microbiota ocular bacteriana indígena

Animal	Espécie	n° de animais	N° de amostras
ANIMAIS SILVESTRES			
Mamíferos			
Grandes felídeos – Tigre	<i>Panthera tigris</i>	4	8
Grandes felídeos – Leoa	<i>Panthera Leo</i>	1	2
Grandes felídeos – Ligre	Híbrido (<i>Panthera tigris</i> X <i>Panthera leo</i>)	1	2
Grandes felídeos – Onça	<i>Panthera onça</i>	1	2
Sagüi-do-tufo-preto	<i>Callithrix penicillata</i>	4	8
Morcego frugívoro	<i>Artibeus lituratus</i>	17	34
Morcego hematófago	<i>Diaemus youngi</i>	12	24
Morcego hematófago	<i>Desmodus rotundus</i>	7	14
Aves			
Coruja-orelhuda	<i>Asio clamator</i>	10	19
Caracará	<i>Caracara plancus</i>	14	27
Pingüim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	14	28
Anfíbio			
Sapo-cururu	<i>Rhinella ictérica</i>	4	8
Répteis			
Jabuti-piranga	<i>Geochelone carbonaria</i>	10	20
TOTAL		99	196

4.4.2) Amostras:

A colheita das amostras foi realizada por meio de fricção gentil de zaragatoas estéreis junto à margem palpebral interna, superfície ocular (córnea e conjuntiva bulbar) e conjuntiva palpebral de cada olho (Figura 1), perfazendo um total de 396 olhos (amostras). Foram utilizados dois tipos de zaragatoa, uma com um calibre de 20 mm de diâmetro e outra menor com calibre de 10 mm de diâmetro. A colheita era feita com luva de procedimento para tentar evitar, ao máximo, contaminação externa. Em seguida as zaragatoas eram colocadas em meio de transporte e armazenadas refrigeradas até o processamento no Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti (CDME) da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado do Paraná.

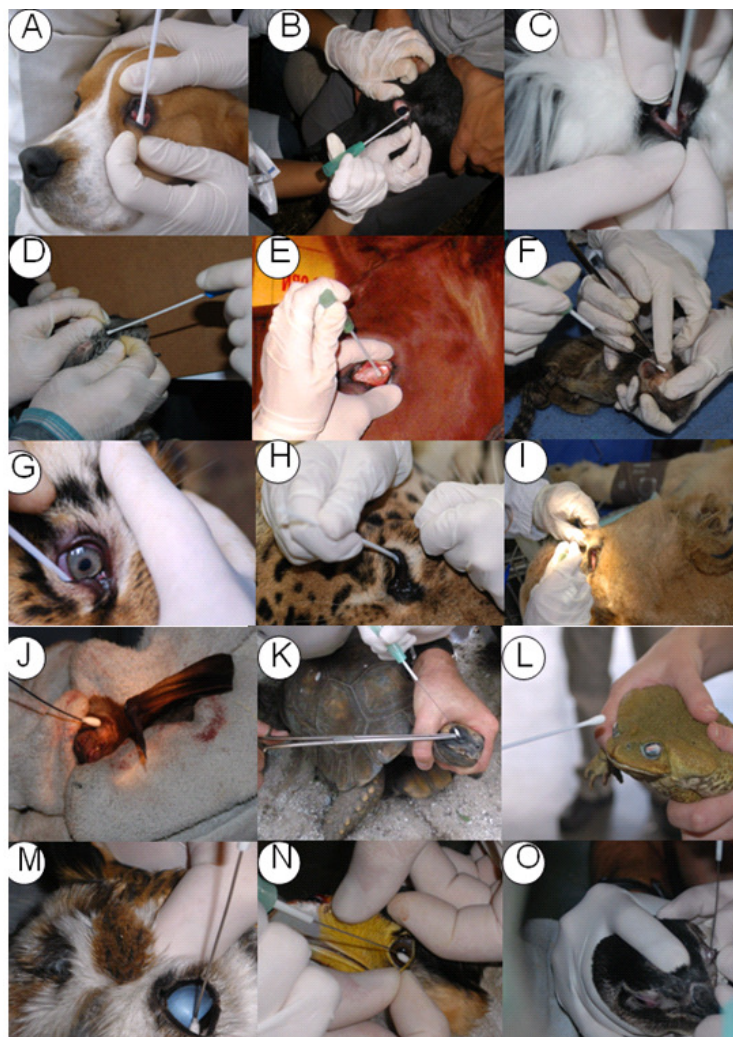


Figura 1. Foto ilustrativa da colheita do material ocular por zaragatoa estéril para cultura bacteriana. Notar que a extremidade da zaragatoa encontra-se junto à conjuntiva palpebral e superfície ocular (córnea e conjuntiva bulbar) nos olhos de diferentes animais. O procedimento foi realizado cuidadosamente para evitar contaminação bacteriana externa. Demonstra-se aqui o momento da colheita em diferentes espécies de animais: A) cão; B) carneiro; C) coelho; D) chinchila; E) cavalo; F) sagüi. Notar a presença de uma pinça hemostática empregada na pele palpebral (externamente) para facilitar o acesso do fórnice conjuntival e a utilização de uma microzaragatoa ; G) tigre; H) onça; I) leoa; J) morcego. Notar aqui a dificuldade em conter o animal e o tamanho pequeno do globo ocular, para este animal foi preciso usar uma microzaragatoa; K) jabuti. Notar a falta de luvas de procedimento do assistente e presença de uma pinça hemostática empregada na pele palpebral (externamente). Ambas as adaptações foram necessárias para facilitar a contenção e acesso da zaragatoa ao fórnice conjuntival, respectivamente; L) sapo; M) coruja; N) caracará; O) pinguim-de-magalhães.

4.4.3) Processamento das amostras:

O material foi semeado em caldo de enriquecimento BHI (*Brain Heart Infusion*) e incubado em aerobiose a 37°C até 48 horas. Com a turvação do caldo indicando crescimento microbiano, uma alçada de 1µL era semeada pela técnica de esgotamento em placas contendo meio ágar sangue de carneiro a 5%. Após 24 a 48 horas de incubação os isolados eram estudados quanto: a) características macroscópicas tais como tamanho, cor e forma das colônias e halo de hemólise e; b) características microscópicas do agente: morfologia e coloração de Gram.

Em seguida, as bactérias Gram-negativas foram semeadas em meio ágar MacConkey para verificação de crescimento e colônias fermentadoras ou não da lactose. A seguir foi realizada a prova da oxidase em tira e uma bateria de provas bioquímicas: utilização de citrato; capacidade de desaminar o aminoácido fenilalanina em ácido fenil pirúvico; capacidade de descarboxilar o aminoácido lisina; produção de indol; motilidade bacteriana; utilização de carboidratos (glicose e lactose) e produção de H₂S.

Os isolados constituídos por cocos Gram-positivos foram semeados em placa de ágar sal-manitol e incubados a 35-37°C por 18 a 24 horas em aerobiose. Os isolados foram submetidos ao teste da catalase em lâmina, em seguida, os isolados catalase-positiva foram identificados por meio de testes da coagulase em tubo e fermentação do manitol. A diferenciação de *S. aureus* de outras espécies coagulase positivas foi feita pela prova do Voges-Proskauer (uso de KOH a 40% e alfa naftol) além da fermentação do açúcar maltose.

4.4.4) Análise estatística:

Os dados foram tabulados em planilha eletrônica, em seguida as variáveis categóricas nominais foram avaliadas e comparadas pelo teste Qui-quadrado, sendo que os valores resultantes de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

4.5 RESULTADOS

Das 396 amostras analisadas neste estudo, 276 tiveram crescimento bacteriano e por haver crescimento de mais de um tipo de bactéria em algumas amostras, foi possível isolar 396 cepas diferentes de 21 gêneros de bactérias (Tabela 3). As bactérias do tipo Gram-positivas foram significativamente mais prevalentes e apareceram em 81% das amostras ($P < 0,05$), contra 19% de bactérias Gram-negativas.

Tabela 3. Resultados encontrados em animais domésticos e silvestres

	Total de bactérias isoladas	Total de amostras	Amostras positivas	Amostras negativas	Gram- positiva	Gram- negativa
Cães	27	24	22	2	23	4
Carneiros	35	30	27	3	25	10
Chinchilas	51	34	31	3	47	4
Cavalos	28	20	20	0	25	3
Coelhos	75	92	56	36	64	11
Morcegos	23	72	21	51	19	4
Grandes felídeos	28	14	14	0	21	7
Sapos	8	8	6	2	4	4
Coruja	18	19	17	2	16	2
Caracará	38	27	23	4	27	10
Sagüis	4	8	4	4	4	0
Pingüim	40	28	21	7	29	11
Jabutis	21	20	14	6	17	4
TOTAL	396	396	276	120	321	74
%	100%	100%	70%	30%	81%	19%

A Tabela 3 descreve os gêneros bacterianos isolados. O gênero significativamente mais prevalente foi *Staphylococcus* sp (39,6%) ($P < 0,05$). Dentro deste gênero, os *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) foram significativamente mais freqüentes (68,2%) ($P < 0,05$). O segundo e o terceiro gênero que mais apareceram foram *Streptococcus* sp. e *Bacillus* sp., respectivamente (Tabela 4). Já dentre as bactérias Gram-negativas (BGN), as mais prevalentes foram as bactérias da família Enterobacteriaceae (54/74) ($P < 0,05$), sendo que dentre essas a *Escherichia coli* foi espécie significativamente mais freqüentes ($P < 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 4. Gêneros bacterianos identificados em animais selvagens e domésticos

Bactéria – Gênero	Cães	carneiros	chinchilas	cavalos	coelhos	morcegos	grandes felídeos	sapos	coruja	gavião	saguais	pinguim	jabutis	TOTAL
GRAM POSITIVA														321
<i>Staphylococcus</i> sp.	15	2	22	17	34	7	10	3	14	7	3	15	8	157
SCP	10	0	12	4	5	0	0	1	8	2	0	8	0	50
SCN	5	2	10	13	29	7	10	2	6	5	3	7	8	107
<i>Micrococcus</i> sp.	0	1	5	0	9	1	2	0	1	1	0	1	0	21
<i>Streptococcus</i> sp.	7	12	14	3	6	0	2	0	0	8	1	6	1	60
<i>Bacillus</i> sp.	1	4	4	5	6	6	5	1	0	4	0	3	8	47
<i>Corynebacterium</i> sp.	0	5	2	0	9	4	2	0	1	7	0	4	0	34
<i>Streptomyces</i> sp.	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2
GRAM NEGATIVA														74
Enterobactérias	4	6	4	0	4	3	7	3	2	9	0	9	3	54
<i>E. coli</i>	4	6	2	0	2	0	3	2	1	7	0	3	0	30
<i>Enterobacter</i> sp.	0	0	0	0	1	0	0	1	0	2	0	1	1	6
<i>Proteus</i> sp.	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3
<i>Shigella</i> sp.	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	1	4
<i>Morganella morganii</i>	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	3
<i>Hafnia alvei</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Serratia</i> sp.	0	0	0	0	1	0	4	0	1	0	0	0	0	6
<i>Klebsiella</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
BGNIF	0	4	0	3	7	1	0	1	0	1	0	2	1	20
<i>Pseudomonas</i> sp.	0	0	0	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	4
<i>Pasteurella multocida</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Alcaligenes</i> sp.	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	1	4
<i>Acinetobacter</i> sp.	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>Neisseria</i> sp.	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	2
<i>Moraxella</i> sp.	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	6
<i>Flavobacterium</i> sp.	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1

SCP: *Staphylococcus* coagulase positivoSCN: *Staphylococcus* coagulase negativo

BGNIF: Bactéria Gram-negativa não fermentadora

4.6 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A microbiota ocular tem sido estudada em diversos animais e nos seres humanos.. Nesta pesquisa obteve-se uma positividade, de forma geral, de 70%. Em alguns grupos de animais estudados (cavalos e grandes felídeos) a totalidade (100%) das amostras foi positiva. Nos gatos domésticos um trabalho mostrou que esses valores podem chegar a 54% ¹⁵ e já em cães, há relatos de positividade entre 39 a 94% ^{15,19}. No presente trabalho houve 70% de positividade nas amostras advindas dos cães. Em seres humanos a positividade pode chegar a 60%²⁰. Essas diferenças observadas entre as diferentes investigações podem ser atribuídas a vários fatores: uso prévio de antibióticos, diferentes formas de coleta, erros na forma de coleta, diferenças das técnicas de cultivo, erros de cultivo, além de diferenças geográficas e climáticas. Para WILSON²⁰, a microbiota indígena ocular é um assunto continuamente debatido no sentido em que se realmente os microrganismos constituem uma microbiota residente ou são meramente transitórios, pois muitas das bactérias encontradas no olho podem também serem encontradas na pele ou trato respiratório, sendo assim, meros achados transitórios, advindo de tecidos próximos.

Um grupo animal que chamou a atenção neste quesito foi o grupo dos morcegos. Nestes animais a positividade das amostras (30%) foi bem menos expressiva quando comparada com os outros grupos animais estudados. Trabalhos sobre a microbiota ocular nestes animais não foi encontrado para comparar este dado. Este achado pode ser devido ao tamanho pequeno do bulbo ocular e a dificuldade em colher as amostras, pois, devido a este fato, não foi possível introduzir a microzaga no saco conjuntival, apenas da superfície da córnea, parte da conjuntiva bulbar e a margem palpebral interna. AYOUB et al. (1994) ²¹, mostraram que o número de bactérias isoladas pode ser diferente em distintas regiões do olho, sendo o fórnice conjuntival superior o local menos contaminado, enquanto que o canto medial o mais contaminado. A temperatura local dessas regiões também pode estar envolvida influenciando o crescimento microbiano. A temperatura na córnea e conjuntiva é mais baixa que a temperatura

corporal em aproximadamente 4°C. Dependendo das condições ambientais como velocidade do vento, umidade e temperaturas muito baixas, esse valor pode ser ainda mais baixo²⁰. Isso pode ter um efeito de seleção de agentes microbianos, principalmente naquelas bactérias mesófilas, em que a variação de temperatura para crescimento não pode ser tão grande. No caso da coleta do grupo dos morcegos, as amostras foram basicamente da região da superfície da córnea e eventualmente da porção bulbar da conjuntiva, sendo que nos outros grupos animais, a coleta foi realizada principalmente do saco conjuntival (fórnice conjuntival).

O presente estudo revelou que a microbiota da superfície ocular saudável de diferentes espécies animais como mamíferos, aves, anfíbios e répteis alberga de forma significativamente marcante bactérias do tipo Gram-positivas. Esse dado corrobora diversos trabalhos de pesquisa da microbiota ocular em animais como em cão^{3,4}, gato⁵, cavalo⁶, guaxinim²², gambá²², coelhos⁹, aves¹⁰, castor¹², furão-europeu¹³, macaco-prego¹⁴ e capivaras²³ nos quais os isolados Gram-positivos foram os mais abundantes.

O olho é um ambiente bastante hostil para as bactérias e para que ocorra o sucesso da colonização microbiana, as bactérias precisam ser capazes de suportar substâncias antimicrobianas presente olho, como lactoferrinas, lisozimas, transferrinas, fosfolipases, além de um dos mais importantes componentes de defesa ocular, as imunoglobulinas²⁰. O sucesso dessa maior sobrevivência entre bactérias do tipo Gram-positivas pode estar relacionado com uma das principais características que as diferem das Gram-negativas: a parede celular. Nas Gram-positivas, a parede é mais espessa e rígida, sendo constituída por uma camada maior de peptidoglicana e ausência de uma membrana externa constituída de lipoproteínas, lipopolissacarídeos e fosfolipídeos²⁴. Talvez, estas características morfológicas influenciem nessa maior sobrevivência, além é claro, de adesinas e receptores específicos que já foram descritos como importantes fatores para que as bactérias colonizem o olho com sucesso²⁰. MAJALI et al. (2007)²⁵ estudando a lactoferrina no leite de camelos com mastite, sugeriram que esta proteína tem uma ação diferente em Gram-positivas e Gram-negativas e, apesar dessa informação

ainda não ter sido comprovada, talvez esta ação também aconteça no olho e selecione o maior sucesso de Gram-positivas.

Os gêneros que foram significativamente mais expressivos foram *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. Esse dois gêneros também aparecem como os mais isolados em diferentes espécies animais como gatos^{5,26}; camelos²⁷, quatis²⁸ e mão-pelada²⁸.

De acordo com SPINELLI et al. (2010)²⁸, os organismos Gram-negativos são frequentemente presentes nos olhos saudáveis dos animais e podem variar entre as espécies, mas que o aumento do número destes pode ser um indicativo de estado anormal da saúde ocular. Todavia, na presente investigação nos olhos nos quais foram isoladas bactérias Gram-negativas, não havia qualquer indício de doença clinicamente aparente, porém os isolados do tipo Gram-positivo sobressaíram de forma significativa. Dentre as bactérias Gram-negativas, as mais isoladas foram as bactérias da família Enterobacteriaceae. Membros desta família são encontrados em diferentes ambientes como solo, plantas, água e no intestino do homem e dos animais²⁹. A espécie que mais teve destaque neste estudo foi *Escherichia coli*. O isolamento de *E. coli* em olhos de animais é um achado relativamente comum e já foi descrito em olhos sadios de cães^{4,19}, cavalos⁶, gatos²⁶, guaxinins²² e camelos²⁷. Por ser um habitante natural do intestino de mamíferos, ela é excretada pelas fezes, podendo sobreviver em partículas fecais, poeira e água por meses²⁹. O seu isolamento neste trabalho pode indicar possível contaminação fecal, sendo neste caso, apenas uma bactéria transitória da conjuntiva. Estudos seqüenciais com novas coletas advindas do mesmo animal, em diferentes dias, poderiam esclarecer o papel desta bactéria como possível membro transitório ou não da microbiota ocular. As outras bactérias isoladas desta família como *Serratia* sp., *Shigella* sp., *Enterobacter* sp., *Morganella morganii*, *Proteus* sp., *Klebsiella* sp. e também já foram descritas em olhos de animais sadios primatas não-humanos³⁰, cães⁴, quatis²⁸ e mão-pelada²⁸, numa proporção baixa, como na presente investigação. Assim como no caso das *E.coli*, estas bactérias não parecem serem residentes do olho e sim, agentes transitórios que por ventura foram encontrados. A pesquisa seqüenciada também parece ser

interessante para melhor definir o papel que esses agentes ocupam na microbiota indígena ocular.

Entre o grupo das bactérias classificadas como Gram-negativas não fermentadoras, o gênero mais encontrado: *Moraxella* sp., destacou-se principalmente no grupo dos carneiros. Este agente está bem descrito em carneiros e bois causando ceratoconjuntivite infecciosa^{8,29}, porém pode estar presente em olhos sadios, como no trabalho de ALMEIDA NETO (2006)⁸, em que a presença deste gênero em olhos sadio de carneiros se sobressaiu até em relação aos *Staphylococcus* sp. As outras bactérias Gram-negativas isoladas como *Flavobacterium* sp., *Acinetobacter* sp. e *Alcaligenes* sp. são consideradas bactérias ambientais²⁹ e ocasionalmente podem ter contaminado os olhos durante o período em que as amostras foram colhidas. As *Pseudomonas* sp., que são microrganismos também classificados como bactérias ambientais²⁹ mas que ocupam um papel importante nas infecções oculares, foram isoladas em poucos animais nesta pesquisa. Outras investigações^{31,32} também têm demonstrado que elas realmente não fazem parte da microbiota normal do olho e são consideradas agentes transitórios oportunistas. A bactéria *Pasteurella multocida* isolada de apenas um olho de coelho, é conhecido por fazer parte da microbiota nasal e respiratório, principalmente em coelhos^{29,33}. De acordo com os achados neste estudo, esta bactéria parece não ser um microrganismo comumente encontrado nos olhos dos animais, até mesmo dos coelhos. Este dado corrobora os dados encontrados na literatura sobre microbiota ocular de coelhos³, em que os autores citam que esta bactéria não é habitante usual dos olhos.

Sendo assim, este trabalho descreveu as principais bactérias encontradas em olhos animais e corrobora maioria de estudos prévios realizados em seres humanos e outros animais sobre a microbiota ocular.

4.7 REFERÊNCIAS

1. SLATTER, D. Fundamentals of veterinary ophthalmology. 3a ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2001, 640 p.
2. DAVIDSON H.J.; ROGERS DP, YEARY TJ et al. Conjunctival microbial flora of clinically normal pigs. Am J Vet Research 1994; 55: 949–951.
3. MOORE CP, NASISSE MP. Clinical microbiology. In: GELLAT, K.N. Vet Ophthalmol. 3a ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 1999, 259–289p.
4. WANG, L.; PAN, Q.; ZHANG, Q. X.; CUI, J.; QI, C.. Investigation of bacteria microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Beijing, China. Vet Ophthalmol, 2008, v. 11, n. 3, 145-149 p.
5. SHEWEN, P. E.; POVEY, R. C.; WILSON, M. R. A Survey of the Conjunctival Flora of Clinically Normal Cats and Cats with Conjunctivitis, Can Vet J. 1980 August; 21(8): 231–233p.
6. ANDREW SE, NGUYEN A, JONES GL , BROOKS, D.E. Seasonal effects on the aerobic bacterial and fungal conjunctival flora of normal thoroughbred brood mares in Florida. Vet Ophthalmol 2003; 6: 45–50p.
7. DAVIDSON HJ, VESTWEBER JG, BRIGHTMAN AH et al. Ophthalmic examination and conjunctival bacteriologic culture results from a herd of North American bison. J Am Vet Med Assoc 1999; 215: 1142–1144.
8. ALMEIDA NETO, J.B., SÁ, F. B.; SILVA, K.P.C.; BUZINHANI, M. Flora conjuntival bacteriana de ovinos sadios da raça Sta Inês e seus mestiços criados na microrregião de Garanhuns, PE. Ciênc. vet. tróp., janeiro/abril, 2006Recife-PE, v. 9, n. 1, 17 – 22p.
9. COOPER SC, MCLELLAN GJ, RYCROFT AN. Conjunctival flora observed in 70 healthy domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Vet Record 2001; 149: 232–235.
10. SILVANOSE CD, BAILEY TA, NALDO JL. Bacterial flora of the conjunctiva and nasal cavity in normal and diseased captive bustards. Avian Dis 2001; 45: 447–451.
11. DUBAY SA, WILLIAMS ES, MILLS K et al. Bacteria and nematodes in the conjunctiva of mule deer from Wyoming and Utah. J Wildl Dis 2000; 36: 783–787.
12. CULLEN CL. Normal ocular features, conjunctival microflora and intraocular pressure in the Canadian beaver (*Castor canadensis*). Vet Ophthalmol 2003; 6: 279–284.
13. MONTIANI-FERREIRA, F., MATTOS, B.C.; RUSS, H. H.A. Reference values for selected ophthalmic diagnostic tests of the ferret (*Mustela putorius furo*). Vet Ophthalmol 2006, v. 9, n. 4, 209-213 p.
14. MONTIANI-FERREIRA, F., SHAW, G., MATTOS, B.C.; RUSS, H. H.A., VILANI, R.G D'O.C. Reference values for selected ophthalmic diagnostic tests of the capuchin monkey (*Cebus apella*) Vet Ophthalmol 2008, v. 11, n. 3, 197-201 p.
15. GERDING PA, KAKOMA I 1990: Microbiology of the canine and feline eye. Vet Clin North Am Small Anim Pract 20: 615-625
16. HSU C, WISEMAN GM. Antibacterial substances from staphylococci. Can J Microbiol 1967;13:947-55.
17. FREDRICKSON AG. Behavior of mixed cultures of microorganisms. Annu Rev Microbiol 1977;31:63-87.
18. CAVUOTO, K.; ZUTSHI, D.; KARP, C. L.; MILLER, D.; FEUER, W. Update on bacterial conjunctivitis in South Florida. Ophthalmol, V.115, n°1, 2008.
19. PRADO, M. R.; ROCHA, M.F.G.; BRITO, E.H.S.; GIRÃO, M.D; MONTERIO, A.J.; TEIXEIRA, M.F.S; et al.. Survey of bacterial microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Fortaleza, Ceara, Brazil. Vet Ophthalmol, 2005, 8 (1), 33-37..
20. WILSON, M. Eye and Its Indigenous Microbiota. In: Microbial Inhabitants of Humans – Their Ecology and Role in Health and Disease. Cambridge University Press, 2005. Cap 3, p107-126.
21. AYOUB, M.; BADR, A.; ELIAN, S.. A study in the effect of antibiotics on the normal flora of the eye. Med J Cairo Univ. vol.62, n°1, March (suppl.):121-128p, 1994. 2.

22. PINARD, C.L.; BRIGHTMAN, A.H.; YEARY, T.J.; EVERSON, T.D.; COX, LI.; CHENGAPP, M.M.; DAVIDSON, H.J.. Normal conjunctival flora in the North American opossum (*Didelphis virginiana*) and raccoon (*Procyon lotor*). J Wildl Dis, 38(4), 2002, 851-855p.
23. MONTIANI-FERREIRA, TRUPPEL, J., TRAMONTIN, M.H.; VILANI, R.G.O.; LANGE, R.R. The capybara eye: clinical tests, anatomic and biometric features. Vet. Ophthalmol 2008, v.11, n.3, 386-394p.
24. TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Microbiologia, 8ed, Artes Médicas Sul, Porto Alegre, 2000.
25. MAJALI, AM.; ISMAIL, Z.B.; AL-HAMI, Y.; NOUR, A.Y. Lactoferrin concentration in milk from camels (*Camelus dromedaries*) with or without subclinical mastitis. Intern J Appl Res Vet Med. 2007, vol5,n3.
26. SOUZA, J.O.T.; ANGELO, F.F.; HOMEM, L.A.S. Microbiota bacteriana conjuntival de felinos domésticos (*Felis catus*, Linnaeus, 1785) sadios da cidade de Juiz de Fora. Rev Cient Eletron Med Vet, ano III, n15, Jul, 2010. .
27. FAHMY, L.S.; HEGAZY, A.A.; ABDELHAMID, M.A.; HATEM, M.E.; SHAMAA, A.A. Studies on eye affections among camels in Egypt: clinical and bacteriological studies. Sc J King Faisal U, vol 4, n2, 2003, 159-176p.
28. SPINELLI, T.P.; OLIVEIRA-FILHO, E.F.; SILVA, D.; MOTA, R.; SÁ, F.B. Normal aerobic bacterial conjunctival flora in the crab-eating raccoon (*Procyon cancrivorus*) and coati (*Nasua nasua*) housed in captivity in Pernambuco and Paraíba (Northeast, Brazil). Vet Ophthalmol 2010, 13 (Supplement 1), 134-136p.
29. QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; MARTER, G.R. 1994. Staphylococcus species, p.118-125. In: Ibid.(Eds), Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe, London,
30. GALERA, P.D.; AVILA, M.O.; RIBEIRO, C.R.; SANTOS, F.V. Estudo da microbiota da conjuntiva ocular de macacos-prego (*Cebus apella*) e macacos bugio (*Alouatta caraya*) provenientes do reservatório de manso, MT, Brasil. Arq Inst Biol, São Paulo, v69, n2, p33-36, 2002.
31. GUTIERREZ, E.H. Bacterial infection of the eye, p69-70. In D. Locatcher-khorazo and B. C. Seegal (ed.). Microbiology of the eye. C. V. Mosby Co., St.Louis.
32. MAYOU, M.S.; COOK, W.L.; SCHLITZER, R.L.; WARD, M.A.; WILSON, L.A.; AHEARN, D.G. Antibigrams, serotypes, and plasmid profiles of *Pseudomonas aeruginosa* associated with corneal ulcers and contact lens wear. J Clin Microbiol, 1986, vol 24, n3, p372-376.
33. DUCLOS, P., CAILLET, J., JAVELLOT, P. Aerobic bacterial flora of the nasal cavity of farmed rabbits. Annal Réch Vét, v.17, n.2, p.185-190, 1986.

5. SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA E CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS DE INFECÇÕES OCULARES DE DIFERENTES ESPÉCIES ANIMAIS

Antimicrobial susceptibility and minimal inhibitory concentration of Pseudomonas aeruginosa isolated from ocular infections of different species of animals

5.1 RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de diferentes espécies animais que apresentavam infecção ocular. Adicionalmente, a concentração inibitória mínima (CIM) de dois importantes antibióticos utilizados na oftalmologia foi investigada. Quinze cepas de *P. aeruginosa* foram isoladas de diferentes espécies animais (cão, gato, cavalo, pingüim e urso) com infecções tais como ceratite, ceratoconjuntivite seca e/ou conjuntivite secundária. Os isolados foram testados frente a um painel de 21 antibióticos, pelo método de disco-difusão. A CIM desses isolados foi determinada pelo método *E-test* para dois antibióticos: tobramicina e ciprofloxacina. O imipenem foi a droga mais efetiva *in vitro*, com 100% das cepas sensíveis, seguida por ciprofloxacina e gatifloxacina (93,7%). Já outros antibióticos tais como a tobramicina, norfloxacina, gentamicina e amicacina foram sensíveis para 86,7% dos isolados. Por outro lado, poucas cepas foram sensíveis a ceftriaxona, tetraciclina, clindamicina e eritromicina. Todos os isolados foram resistentes a cefovecina e amoxicilina. A CIM de ciprofloxacina variou de 0,13 a 12 µg/ml e para tobramicina, já a CIM de tobramicina variou de 0,25 a 128 µg/ml. A concentração de colírios comerciais usados para tratamento local (3 mg/ml), no caso da ciprofloxacina, excede os valores de CIM das cepas estudadas no presente estudo se usados a cada quatro horas. Já para tobramicina com colírios na mesma concentração, a CIM pode não ser alcançada para algumas cepas mais resistentes de *P. aeruginosa* e seu uso pode não ser clinicamente efetivo nestes casos. Portanto, frente a uma infecção ocular por *P. aeruginosa* recomenda-se diminuir o intervalo de instilação de colírios de tobramicina de quatro para aproximadamente a cada duas horas.

Palavras-chave: bactérias, olho, colonização ocular, oftalmologia

5.2 ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the antibiotic susceptibility profile of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different animal species with ocular infection. Additionally, minimum inhibitory concentration (MIC) was investigated. Fifteen strains of *P. aeruginosa* were isolated from different animal species (dog, cat, horse, penguin and bear) with ocular infection such as keratitis, keratocojunctivits sicca and/or conjunctivitis. These isolates were tested against 21 antimicrobials using the disk diffusion method. The MIC of these isolates was determined using gradient strip difusion (*E-test*) method to two important antibiotics: tobramycin and ciprofloxacin. Imipenem was the most effective *in vitro* antibiotic with 100% of the strains being susceptible, followed by ciprofloxacin and gatifloxacin (93.7%). Tobramycin, norfloxacin, gentamicin and amikacin showed an efficacy of 86.7%. A low susceptibility rate was found for ceftriaxon, tetracillin, clindamycin, and erythromycin. All isolates were resistant to cefovecin and amoxicillin. The MIC of ciprofloxacin ranged from 0.13 to 12 µg/ml. For tobramycin, the MIC ranged from 0.25 to 128 µg/ml. The concentration of ciprofloxacin eye drops used for topical treatment (3 mg/ml) exceeds the MIC values for all strains if used until 4hours after the instillation. For tobramycin, however, eye drops, also at the same concentration, an ideal MIC cannot be reached for for some resistant strains *P. aeruginosa*. Thus for ocular infections with *P. aeruginosa* the ideal recommendation would be to decrease the frequency interval from four to every two hours, when using tobramycin.

Key-words: antibiotic, bacteria, ocular infections, antimicrobial profile

5.3 INTRODUÇÃO

O bacilo Gram-negativo *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria com ampla distribuição ambiental, estando presente em amostras de solo e água¹. Este agente é freqüentemente isolado em casos de infecção ocular oportunista, como blefarites, conjuntivites, dacriocistites, endoftalmites e ceratites². Em animais de companhia as doenças corneanas causadas por este agente é uma doença séria e relativamente comum. Nos cavalos, nos quais podem apresentar ceratites severas, esta bactéria é particularmente devastadora e de difícil cura^{3,4}.

Este microrganismo está entre os mais virulentos agentes associados a uma infecção ocular⁵, possuindo uma variedade de fatores e mecanismos de virulência que permitem uma colonização eficiente em tecidos oculares comprometidos e subsequentemente, uma ação destrutiva severa principalmente do estroma corneano. O efeito devastador desta bactéria demonstrado nas camadas da córnea é mediado por proteases que destroem as proteínas e por exotoxinas que causam morte das células epiteliais e endoteliais. Outro fator de virulência que contribui para a invasão e destruição nos tecidos e ainda uma colonização mais eficiente, são as hemolisinas^{3, 4, 5}. O pigmento piocianina também possui papel importante como fator de virulência contribuindo para o dano tecidual e inibindo as células de conseguirem oxigênio^{3,6}.

A presença desta bactéria no olho não significa necessariamente uma infecção. Estudos têm demonstrado que as pseudomonas podem fazer parte da microbiota ocular normal, parecendo normalmente ser um agente transitório oportunista. A superfície ocular, principalmente a córnea, geralmente precisa de um fator primário de agressão, como um trauma mecânico ou químico para que um processo infeccioso seja instalado⁷.

O tratamento médico das infecções oculares por *Pseudomonas aeruginosa* consiste geralmente de antibioticoterapia tópica agressiva. Todavia espera-se que as infecções se tornem menos responsivas aos antibióticos ao longo do tempo devido o aparecimento de mecanismos de resistência nas bactérias. Por isso, o

monitoramento do perfil de resistência mostra-se importantíssimo na prática médica empírica, pois, devido à agressividade devastadora de uma infecção por *Pseudomonas aeruginosa*, nem sempre os clínicos têm tempo para esperar o resultado do antibiograma. Desta forma os testes de susceptibilidade a antimicrobianos são especialmente importantes quando *P. aeruginosa* é isolada de infecções oculares, principalmente porque o aparecimento de cepas multirresistentes não é incomum neste microrganismo³ além de servir como dado epidemiológico importante.

A concentração inibitória mínima (CIM) é a menor concentração que um antibiótico precisa atingir para inibir visivelmente o crescimento microbiano após uma noite de incubação. Por ser considerado um dado quantitativo, a CIM é considerada uma importante ferramenta de diagnóstico para a confirmação de cepas resistentes as drogas antimicrobianas^{8,9} e planejamento terapêutico.

Este trabalho teve por objetivo avaliar a susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* a diferentes antibióticos e a concentração inibitória mínima para tobramicina e ciprofloxacina de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de olhos de diferentes animais (cães, gato, cavalos, pingüim-de-magalhães e urso-pardo) com sinais clínicos de doença ocular.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1) Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas

Durante o período de março de 2009 a janeiro de 2011, das amostras advindas da casuística de oftalmologia do Hospital Veterinário da UFPR, foi possível isolar cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que foram usadas para este estudo.

5.4.2) Animais que participaram do estudo

Participaram deste estudo cinco diferentes espécies de animais: dez cães (*Canis familiaris*), um gato (*Felis catus*), dois cavalos (*Equus caballus*), um

pingüim-de-magalhães (*Spheniscus magallanicus*) e um urso-pardo (*Ursus arctus*) (Figura 1). O critério de inclusão no estudo foi presença de secreção ocular mucopurulenta, como sinal clínico, nos pacientes examinados. Portanto, todos os pacientes apresentavam diferentes doenças oculares primárias. Entre eles foram observados os seguintes diagnósticos clínicos: úlcera de córnea (6) ceratoconjuntivite seca (5) e conjuntivites com secreção de aspecto mucopurulento primárias (2) ou secundária à fístula infraorbitária (2). A Tabela 1 apresenta as doenças oculares diagnosticadas e os respectivos animais.

Tabela 1. Lista dos animais estudados e as doenças oculares diagnosticadas nas quais *P. aeruginosa* foi isolada.

Número de amostras	Animal	Doença ocular diagnosticada
1	Cão	Úlcera de córnea
2	Cão	Fístula infraorbitária + conjuntivite
3	Cão	CCS*
4	Cão	Úlcera de córnea
5	Cão	Úlcera de córnea
6	Cão	CCS*
7	Cão	CCS*
8	Cão	Fístula infraorbitária + conjuntivite
9	Cão	CCS*
10	Cão	CCS*
11	Gato	Úlcera de córnea
12	Cavalo	Úlcera de córnea
13	Cavalo	Úlcera de córnea
14	Pinguim	Conjuntivite
15	Urso	Conjuntivite

*ceratoconjuntivite seca

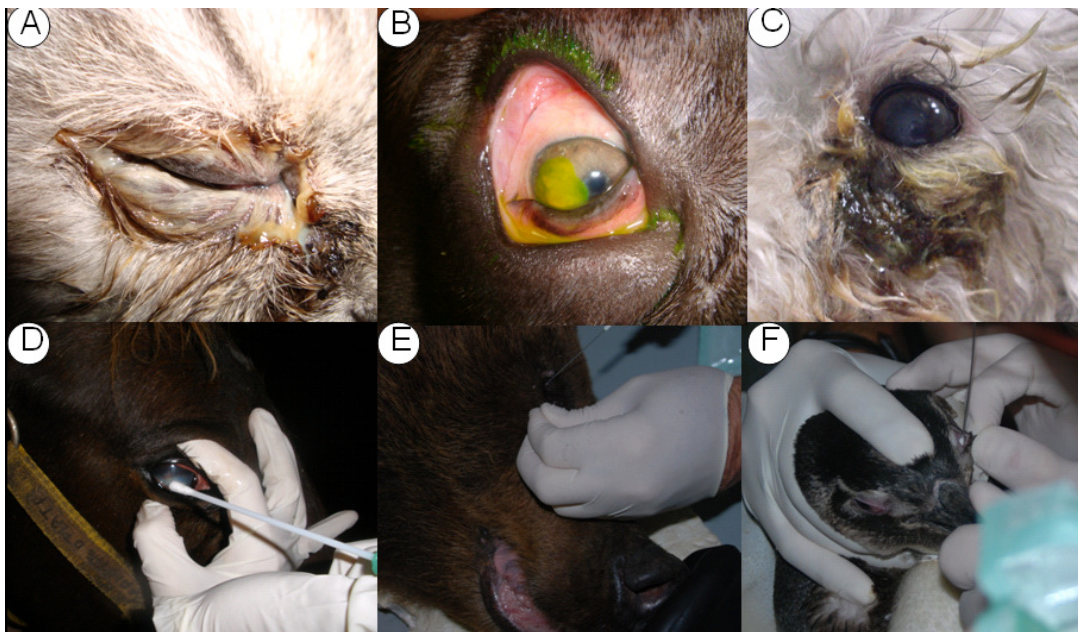


Figura 1. Foto representativa de alguns dos animais estudados durante este estudo. Todos apresentavam infecção ocular por *P.aeruginosa*. A) Gato diagnosticado com úlcera de córnea com secreção ocular mucopurulenta intensa; B) Olho de um cão após ser submetido ao teste de fluoresceína, antes deste procedimento foi colhido material para exame microbiológico; C) Cão com fístula infra-orbitária e conjuntivite; D) Cavalo com ceratite ulcerativa sendo submetido à colheita de material com zaragatoa estéril; E) Urso-pardo sendo submetido à coleta de material por meio de zaragatoa estéril para exame microbiológico; F) Pinguim-de-magalhães sendo contido manualmente para coleta de material para exame microbiológico.

5.4.3) Coleta das amostras e processamento

Com a colaboração de médicos veterinários do Hospital Veterinário da UFPR, Curitiba, as amostras foram colhidas por meio de zaragatoas estéreis, preservadas em meio de transporte Stuart e mantidas em refrigeração (no máximo até 24 horas) até serem enviadas ao Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti (CDME) da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado do Paraná. e processadas.

A identificação foi baseada na morfologia das colônias em ágar sangue de carneiro a 5%, micromorfologia tintorial, crescimento em MacConkey, crescimento em meio ágar verde-brilhante e prova da oxidase positiva¹.

5.4.4) Perfil de susceptibilidade a agentes antimicrobianos

O teste de susceptibilidade a antimicrobianos (TSA) das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foi realizado em Ágar Mueller Hinton pelo método de Disco Difusão em meio sólido (método de Kirby-Bauer), conforme metodologia descrita no *Clinical Laboratory Standards Institute*¹⁰.

Foi preparado um inoculo em tubos contendo caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) a partir de colônias isoladas em meio de cultura ágar sangue. Essa suspensão era incubada em estufa a 35°C até obter uma turvação equivalente a 0,5 da escala de MacFarland. Em seguida, foram inoculadas em meio de Agar Mueller Hinton utilizando zaragatoa estéril; após 5 minutos para estabilização das culturas em estufa a 35°C, eram adicionados às placas discos impregnados com antimicrobianos. Vinte e um (21) discos de antibióticos (Newprov®, Curitiba, Paraná, Brasil) foram usados: enrofloxacina (10µg), ciprofloxacina (10µg), norfloxacina (10µg), gatifloxacina (10µg), tobramicina (10µg), gentamicina (10µg), amicacina (30µg), neomicina (30µg), clindamcina (2µg), eritromicina (15µg), azitromicina (10µg), amoxicilina (10µg), ampicilina (10 µg), ceftriaxona (10µg), cefovecina (30µg), amoxicilina com ácido clavulânico (20 µg/10 µg), imipenem (10gµ), polimixina B (300U), sulfazotrim (10µg), cloranfenicol (10µg) e tetraciclina (10µg). Após a colocação dos discos de antibióticos, as placas eram incubadas a 35°C por 24 horas. Pós esse período, os isolados eram examinados quanto ao aparecimento de halos de inibição, os quais foram cuidadosamente mensurados com uma régua. Em seguida, as cepas foram classificadas em susceptível, intermediária ou resistente, baseado no critério de interpretação desenvolvido pelo CLSI¹⁰.

5.4.5) Concentração inibitória mínima

Todas as cepas foram submetidas ao teste de concentração inibitória mínima para dois antibióticos: tobramicina (concentração de 0,016 a 256 µg/ml) e ciprofloxacina (concentração de 0,002 a 32 µg/ml). Para tanto foi empregado um sistema comercial de difusão em gradiente (*Epsilon* Test ou, na forma abreviada, E-test®, AB Biodisk, Solna, Suécia), que são fitas impregnadas com gradiente exponencial das drogas.

O procedimento do preparo das placas para este teste foi igual ao realizado para o teste de disco difusão, sendo estes os mesmos preconizados como procedimentos adequados a serem realizados seguindo instruções do fabricante (AB-Biodisk) e modificada por CAPOOR et al. (2006)¹¹. Os resultados foram quantificados em µg/ml e os valores de classificação (sensível, intermediário ou resistente) foram interpretados segundo documento do fabricante (AB-Biodisk, Solna, Suécia).

5.4.6) Análise estatística

Os dados foram tabulados e foi feita estatística descritiva para as variáveis categóricas nominais.

5.5 RESULTADOS

Das 127 amostras oculares enviadas para estudo microbiológico durante o período de março de 2009 a janeiro de 2011, foi possível isolar 171 bactérias (Tabela 2), das quais 46,8% foram *Staphylococcus* sp., 12,3% *Bacillus* sp., 10,5% *Streptococcus* sp., 8,8% *Pseudomonas aeruginosa*, 8,1% enterobactérias, 6% outros bacilos Gram-negativos não fermentadores (diferentes de *Pseudomonas aeruginosa*), 4% *Corynebacterium* sp. e 3,5% *Micrococcus* sp..

Tabela 2: Bactérias isoladas da superfície ocular de diferentes espécies animais com problemas oftálmicos

Bactérias isoladas	Valor absoluto	%
<i>Staphylococcus</i> sp.	80	46,8%
<i>Bacillus</i> sp.	21	12,3%
<i>Streptococcus</i> sp.	18	10,5%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15	8,8%
Enterobactérias	14	8,2%
Outros BGNNF*	10	5,8%
<i>Corynebacterium</i> sp.	7	4,1%
<i>Micrococcus</i> sp.	6	3,5%
Total	171	100%

*BGNNF: Bacilo Gram-negativo não fermentador

No teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, imipenem foi a única droga a alcançar 100% de susceptibilidade *in vitro*. Outras drogas que mostraram boa susceptibilidade *in vitro* foram ciprofloxacina e gatifloxacina com 93,3% de susceptibilidade, seguidas de tobramicina, gentamicina e amicacina, todas com 86,7% de susceptibilidade *in vitro*. As drogas que apresentaram resistência em muitos isolados foram: ceftriaxona, tetraciclina, clindamicina e eritromicina. Todos os isolados foram resistentes *in vitro* à cefovecina e à amoxicilina.

Apenas uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* foi resistente à ciprofloxacina (isolada de um cão com ceratoconjuntivite seca – caso número 6) e duas cepas foram resistentes à tobramicina (uma de um cão ceratoconjuntivite seca e outra de uma úlcera de córnea em um cavalo, casos 6 e 12, respectivamente).

Tabela 3. Perfil *in vitro* de susceptibilidade aos antimicrobianos de cepas de *P. aeruginosa* isoladas de olhos doentes de diferentes espécies animais

Droga ^a /amostra	1 ^b	2 ^b	3 ^b	4 ^b	5 ^b	6 ^b	7 ^b	8 ^b	9 ^b	10 ^b	11 ^c	12 ^d	13 ^d	14 ^e	15 ^f	S	I	R
ERO	S	R	I	S	S	R	I	R	R	R	I	I	S	I	I	26,7%	40%	33,3%
CIP	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	93,3%	0	6,7%
NOR	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	86,7%	0	13,3%
GAT	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	93,3%	0	6,7%
TOB	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	86,7%	0	13,3%
GEN	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	86,7%	0	13,3%
AMI	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	86,7%	0	13,3%
NEO	S	R	I	S	S	R	I	I	S	S	S	R	S	S	S	60%	20%	20%
CLI	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	6,7%	0	93,3%
ERI	I	R	I	R	S	R	I	R	R	R	R	R	I	I	R	6,7%	40%	53,3%
AZI	R	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	66,7%	0	33,3%
POL	I	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	80%	6,6%	13,4%
AMP	I	R	S	R	S	R	S	R	R	S	R	S	R	R	R	33,3%	6,6%	60%
AMO	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	0	0	100%
AMC	I	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	20%	6,6%	73,3%
CRO	I	I	I	I	I	R	I	I	S	R	R	R	R	I	R	6,7%	53,3%	40%
CEF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	0	0	100%
IMI	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	100%	0	0
TET	R	R	R	R	R	R	S	I	R	R	R	R	R	R	R	6,7%	6,6%	86,6%
SUT	R	I	I	S	R	R	I	R	R	R	S	R	R	R	R	13,3%	20%	66,6%
CLO	R	R	R	R	S	R	I	R	I	R	S	I	I	S	I	20%	33,3%	46,6%

a. Droga: ERO, enrofloxacin; CIP, ciprofloxacina; NOR, norfloxacina; GAT, gatifloxacina; TOB, tobramicina; GEN, gentamicina; AMI, amicacina; NEO, neomicina; CLI, clindamicina; ERI, eritromicina; AZI, azitromicina; POL, polimixina B; AMP, ampicilina; AMO, amoxicilina; AMC, amoxicilina-ácido clavulânico; CRO, ceftriaxona; CEF, cefovecina; IMI, imipenem; TET, tetraciclina; SUT, sulfazotrim; CLO, cloranfenicol.

Susceptibilidade: S, susceptível; I, intermediário; R, resistente.

b. Cepa isolada de cão; c. Cepa isolada de gato; d. Cepa isolada de cavalo; e. Cepa isolada de pingüim; f. Cepa isolada de urso

Na Tabela 4 são apresentados os valores da CIM ($\mu\text{g/ml}$) encontrados nas 15 cepas de *P. aeruginosa* para os dois antibióticos testados: ciprofloxacina e tobramicina. Apenas uma cepa apresentou CIM condizente com resistência *in vitro* para ciprofloxacina e duas foram intermediárias. Duas cepas foram resistentes *in vitro* para tobramicina e uma com susceptibilidade intermediária.

Tabela 4: Concentração inibitória mínima (CIM) de 15 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de olhos de animais de diferentes espécies.

Amostra	CIP($\mu\text{g/ml}$) ^a		TOB($\mu\text{g/ml}$) ^a	
1 ^b	3,00	I	9,00	I
2 ^b	0,19	S	2,00	S
3 ^b	0,13	S	2,00	S
4 ^b	0,94	S	1,50	S
5 ^b	0,25	S	0,25	S
6 ^b	12,00	R	128,00	R
7 ^b	0,19	S	3,00	S
8 ^b	0,38	S	4,00	S
9 ^b	0,94	S	1,00	S
10 ^b	0,94	S	1,00	S
11 ^c	0,94	S	1,50	S
12 ^d	2,00	I	48,00	R
13 ^d	0,94	S	1,00	S
14 ^e	0,94	S	1,50	S
15 ^f	0,94	S	1,00	S

a. Droga: CIP, ciprofloxacina ($S \leq 1$; $I \geq 2$; $R \geq 4$) ;

TOB, tobramicina ($S \leq 4$; $I \geq 8$; $R \geq 16$)

Susceptibilidade: S, susceptível; I, intermediário; R, resistente.

b. Cepa isolada de cão

c. Cepa isolada de gato

d. Cepa isolada de cavalo

e. Cepa isolada de pinguim

f. Cepa isolada de urso

A CIM para ciprofloxacina variou de 0,13 $\mu\text{g/ml}$ a 12 $\mu\text{g/ml}$ e a média foi de 1,65 $\mu\text{g/ml}$. Para tobramicina a CIM variou de 0,25 $\mu\text{g/ml}$ a 128 $\mu\text{g/ml}$. A média foi de 13,65 $\mu\text{g/ml}$. Na Tabela 5 demonstra-se a análise estatística descritiva dos resultados.

Tabela 5: Resultados da estatística descritiva dos valores encontrados para a concentração inibitória mínima (CIM) para ciprofloxacina e tobramicina das 15 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de olho doente em diferentes espécies animais

Parâmetros da estatística descritiva	CIM para CIP ^a	CIM para TOB ^a
Média	1,65 $\mu\text{g/ml}$	13,65 $\mu\text{g/ml}$
Erro padrão	0,764	8,733
Mediana	0,94 $\mu\text{g/ml}$	1,5 $\mu\text{g/ml}$
Moda	0,94 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$
Desvio padrão	2,96	33,82
Mínimo	0,125 $\mu\text{g/ml}$	0,25 $\mu\text{g/ml}$
Máximo	12 $\mu\text{g/ml}$	128 $\mu\text{g/ml}$
Nível de confiança (95.0%)	1,639	18,731

a. Drogas: CIP, ciprofloxacina , TOB, tobramicina.

5.6 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Dentre as diversas bactérias isoladas no presente estudo, visou-se destacar a importância da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de infecções oculares apresentando secreção mucopurulenta intensa. Esta bactéria parece de fato possuir um papel principalmente importante quando problemas primários como ceratoconjuntivite seca, úlcera de córnea e casos de conjuntivites secundárias a fistula infraorbitárias abrem uma oportunidade de colonização e estabilização de uma infecção ocular.

As fluoroquinolonas são importantes drogas comumente utilizadas no tratamento das infecções oculares e os resultados de disco-difusão para os antibióticos pertencentes a este grupo variaram de acordo com o princípio ativo. Para enrofloxacin por exemplo, foi encontrada baixa eficácia *in vitro* para as cepas de *P. aeruginosa*. Este resultado também foi observado por outros autores ao pesquisarem cepas de *P.aeruginosa* isoladas de casos de ceratites de cães e gatos^{13,12}. Já a ação *in vitro* de norfloxacin contra *Pseudomonas aeruginosa* foi satisfatória, uma vez que apenas duas cepas foram resistentes (2/15), sendo uma de cão e outra de cavalo. Em outro estudo envolvendo cepas provenientes de cães com ceratites também foi encontrada boa eficácia desta droga, uma vez que apenas uma cepa (1/27) foi resistente¹⁴. Para ciprofloxacina, apenas uma cepa (1/15; 93,7%) de *P. aeruginosa* apresentou resistência *in vitro*. Tal resultado corroborou LIN e PETERSEN-JONES (2007)¹³ que também encontraram alta eficácia *in vitro* deste fármaco contra *Pseudomonas aeruginosa*, mais precisamente 95% (1/20) dos isolados de cães com úlceras de córnea foram sensíveis. Em outra investigação¹² com cepas isoladas de ceratite ulcerativa de gatos, o resultado foi ainda melhor, com 100% dos isolados sensíveis. Destaca-se que a fluoroquinolona de quarta geração, gatifloxacina, extremamente empregada por oftalmologistas médicos, também mostrou alta sensibilidade *in vitro* contra *P. aeruginosa* na presente investigação uma vez que apenas uma cepa (oriunda de um cão) foi resistente (1/15). Resultado este diferente do encontrado no estudo de

LEDBETTER et al. (2007)¹⁵, com isolados de *P. aeruginosa* advindas de olhos de cães, no qual os autores encontraram 100% de eficácia a esta droga. Vale lembrar que, em comparação com as gerações anteriores, as fluoroquinolonas de quarta geração têm um espectro ampliado de atividade contra bactérias Gram-positivas, anaeróbias, micobactérias, e espécies de *Chlamydia*, e *Mycoplasma*^{3,15-16}. Outra característica importante a ser enfatizada é que apesar do espectro de ação das fluoroquinolonas de terceira e de quarta geração ser mais amplo em comparação com gerações anteriores (especialmente ciprofloxacina), elas são menos ativas contra muitas bactérias gram-negativas, incluindo a *P. aeruginosa*.^{15,16}. Portanto, contra a corrente de mercado que atualmente pressiona para que os clínicos passem a prescrever tais drogas, ressalta-se que de acordo com a literatura e também de acordo com os dados neste estudo, não houve diferença *in vitro* entre a atividade de gatifloxacina (quarta geração) e ciprofloxacina (fluoroquinolona de segunda geração) contra as cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, ou seja, todas as cepas que foram sensíveis a ciprofloxacina, foram também sensíveis a gatifloxacina. Apesar de não ter sido testado neste trabalho o antibiótico moxifloxacina, uma fluoroquinolona de quarta geração utilizada na oftalmologia, ela também não tem uma boa ação contra *Pseudomonas aeruginosa* de acordo com a literatura¹⁶, sendo a ciprofloxacina mais indicada nestes casos.

Para os antimicrobianos pertencentes ao grupo dos aminoglicosídeos testados no presente estudo, 86,7% das cepas foram sensíveis *in vitro* à gentamicina, tobramicina e amicacina. LIN e PETERSEN-JONES (2008)¹² investigando cepas de *P. aeruginosa* vindas de casos de ceratite felina encontraram uma taxa de suscetibilidade *in vitro* de 100% para tobramicina e gentamicina. Em um estudo semelhante com cães, LIN e PETERSEN-JONES (2007)¹³ também encontraram altas taxas de suscetibilidade *in vitro* para a amicacina, tobramicina e gentamicina (100%, 80% e 75%, respectivamente) isoladas de cães com lesão em córnea. HARIHARAN et al, (1995)¹⁷ em uma pesquisa com cepas de *P. aeruginosa* isoladas de diferentes animais e diferentes sítios de infecção, encontrou 100% das cepas sensíveis a tobramicina e amicacina, e para gentamicina, só houve cepa resistente advinda de amostras

caninas, mas ainda sim com uma boa susceptibilidade *in vitro* (95%). TOLAR et al. (2006)¹⁴ também encontraram 100% de susceptibilidade *in vitro* das cepas isoladas a partir de olhos de cães com lesão em córnea. Apesar dos nossos resultados demonstrarem uma taxa um pouco mais baixa, consideramos que este grupo ainda seria uma boa escolha na maioria dos casos de infecções oculares por *P. aeruginosa*. Todavia, para *Staphylococcus* sp., que de acordo com VARGES et al (2009)¹⁸ é outro isolado freqüente em olhos dos animais, tanto gentamicina como a tobramicina não são muito eficazes (47,5% das cepas foram resistentes a gentamicina e 65% eram resistentes à tobramicina), demonstrando mais uma vez, a importância da caracterização do patógeno nas doenças bacterianas oculares e seu respectivo padrão de sensibilidade.

Nesta investigação 60% das cepas foram sensíveis *in vitro* à neomicina e valor semelhante (63%) também foi encontrado em outro estudo de cepas advindas de ceratite ulcerativa felina¹². A neomicina é uma importante droga encontrada em formulações oftálmicas e a combinação desta droga com polimixina B e bacitracina, pode maximizar o espectro de atividade antibacteriana para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A *Pseudomonas* sp. é freqüentemente resistente à neomicina, todavia polimixina B tende a ser mais bactericida contra a maioria das bactérias Gram-negativas, incluindo *Pseudomonas* sp.¹⁹. Em nosso estudo, 80% das cepas estudadas de *P. aeruginosa* foram sensíveis à polimixina B, porém há estudos que chegam a ter 100% de cepas isoladas de animais sensíveis à polimixina B^{14,17} até uma baixa taxa de susceptibilidade, como no trabalho de LIN e PETERSEN-JONES (2007)¹³, em que os pesquisadores encontraram apenas 40% das cepas sensíveis *in vitro*. Interessantemente, pode-se notar no presente estudo (Tabela 2) que quase todas as cepas que foram resistentes ou intermediárias à neomicina, foram sensíveis à polimixina B, ou vice-versa, reforçando a idéia de que esta combinação seria uma boa alternativa em formulações oftálmicas. De fato esta combinação é amplamente utilizada por oftalmologistas veterinários nos Estados Unidos da América. Todavia, esta combinação não está disponível comercialmente no Brasil, só em algumas farmácias de manipulação¹⁹.

Entre o grupo dos macrolídeos testados (eritromicina, clindamicina e azitromicina), o mais comumente encontrado em medicamentos oculares é a eritromicina²⁰. Na presente investigação, apenas um isolado foi sensível (6,7%) a esta droga. Um estudo anterior¹³ também demonstrou que entre os antibióticos disponíveis comercialmente para uso oftálmico tópico, este fármaco foi o menos efetivo *in vitro* contra cepas de pseudomonas, uma vez que 80% dos isolados foram resistentes. Esta droga age principalmente contra bactérias Gram-positivas e é particularmente útil no tratamento de infecções estreptocócicas²¹.

Já as penicilinas e cefalosporinas são antimicrobianos ocasionalmente utilizados na prática oftalmológica (geralmente em casos de infecções de pálpebra, periorbital ou intra-ocular)²¹. Na presente investigação quase todas as drogas testadas deste grupo apresentaram altas taxas de resistência. Isto pode ser atribuído a um importante mecanismo de resistência (produção de β -lactamases) encontrado nestas bactérias. Poucas cepas foram sensíveis (33,3%) à ampicilina e no caso da amoxicilina, todas as cepas estudadas foram resistentes (100%), sendo esta, a droga com menor eficácia neste estudo. A amoxicilina com ácido clavulânico teve apenas 20% das cepas sensíveis *in vitro*. Este resultado não foi um achado inesperado, uma vez que as penicilinas e aminopenicilinas não são eficazes contra *Pseudomonas* sp.²². Para o antibiótico amoxicilina, mesmo com adição do ácido clavulânico, HARIHARAN et al (1995)¹⁷ também encontraram 100% de cepas resistentes, reforçando a idéia de que estes antibióticos citados não são recomendados em casos de infecção por *Pseudomonas* sp. Isolados de *Pseudomonas aeruginosa* de gatos em um estudo conduzido em Taiwan¹² apontou que apenas 37% das cepas foram sensíveis a ampicilina *in vitro*. Já em um estudo conduzido no Nepal, com cepas isoladas de seres humanos com problemas oftálmicos, mostrou que 100% dos isolados foram resistentes *in vitro* a ampicilina²³. Em relação à cefovecina, esta não foi ativa *in vitro* contra as cepas de *P. aeruginosa* testadas, corroborando resultados de STEGEMANN et al (2006)²⁴. A cefovecina é uma cefalosporina semi-sintética de espectro estendido, recentemente lançado no mercado nacional, sendo muito bem divulgada no mercado e relativamente onerosa para os padrões da medicina veterinária, sendo

indicada para o tratamento de infecções bacterianas em cães e gatos, exibindo ampla atividade contra uma gama de patógenos Gram-negativos, porém, como outras cefalosporinas de espectro estendido como ceftriaxona e cefotaxime, não possui boa ação contra *Pseudomonas aeruginosa*²⁴.

Nenhum dos isolados apresentou resistência *in vitro* ao carbapenêmico imipenem, antibiótico comumente usado em seres humanos em infecções por *P. aeruginosa* multirresistentes. O fato de não termos observado cepas resistentes deve ser destacado, principalmente quando comparado aos achados obtidos na oftalmologia médica de cepas de *P. aeruginosa* isoladas de casos de seres humanos, nas quais a resistência *in vitro* pode chegar a 40%²⁵. Mesmo assim, esta droga raramente é usada na medicina veterinária, pois a terapia ainda tem um custo elevado²⁶ e dificuldade de obtenção da droga. Nas infecções oculares por cepas de *P. aeruginosa* multirresistente, pode-se usar esta droga a partir do preparo de soluções intravenosas, mas na forma de colírio²⁷. Além do preço elevado, há mais uma desvantagem, estas soluções são instáveis, devendo ser utilizadas até 48 horas e mantidas sob refrigeração¹⁹.

O cloranfenicol, mesmo sendo uma droga de amplo espectro, teve pouca eficácia neste estudo. Este antibiótico é menos eficaz do que os aminoglicosídeos e fluoroquinolonas contra bactérias Gram-negativas e geralmente tem pouca eficácia contra *P. aeruginosa*²⁰. Este trabalho corrobora essa informação e outras pesquisas^{15,17} que também apontam pouca eficiência do cloranfenicol contra esta bactéria. Devido à alta incidência de *Pseudomonas* spp. envolvidas em casos de ceratite infecciosa eqüina^{3,6} sugere-se que cloranfenicol não seja uma boa escolha para a terapia empírica em cavalos. Apesar disso, uma formulação na forma de pomada oftálmica com o nome comercial Epitezan (Allergan®, São Paulo, Brasil) é amplamente empregado por oftalmologistas veterinários nas úlceras de córnea.

Poucas cepas isoladas (2/15) foram sensíveis ao sulfazotrim. Um estudo anterior também demonstrou que uma minoria de cepas de *P. aeruginosa* (4/20) foi sensível a esse medicamento¹³. De acordo com Kohler et al. (1996)²⁸ a

potência dessa droga contra *P. aeruginosa* é limitada, e a razão para esta resistência intrínseca é desconhecida. Têm-se sugerido uma fraca afinidade das enzimas alvo e baixa permeabilidade da membrana externa.

Portanto, no presente estudo, os antibióticos testados mais potentes *in vitro* contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de olhos doentes de animais foram: 1: imipenem, 2: ciprofloxacina e gatifloxacina, 3: norfloxacina, tobramicina, gentamicina e amicacina. Todavia, pela dificuldade em usar o carbapenêmico imipenem, a melhor opção de uso em casos de doenças infecciosas oculares em que *P. aeruginosa* são ciprofloxacina e gatifloxacina.

Neste trabalho também foi testada a CIM de dois importantes antibióticos utilizados na prática oftálmica veterinária, ciprofloxacina e tobramicina. Os antibióticos tobramicina e ciprofloxacina sob a forma de colírio, têm uma concentração comercial de 3 mg/ml em solução^{29,30}. Se uma gota (cerca de 0,05 ml) é instilada no olho, a solução ainda mantém uma concentração de 0,15 mg do antibiótico. Sabendo-se que apenas uma gota cabe no fórnice conjuntival²⁹ e desta, 10 a 25 µL da droga é que permanece no fórnice conjuntival^{29,30}, ainda assim, tem-se uma concentração de 75 µg da droga. A CIM para ciprofloxacina no presente trabalho variou de 0,13 a 12 µg/ml, portanto, para esta droga, a quantidade possivelmente presente no fórnice conjuntival ultrapassaria a CIM das cepas testadas. Já para tobramicina a CIM variou de 0,25 a 128 µg/ml, sendo assim, uma das cepas testadas aproximou-se perigosamente da CIM (48 µg/ml) e outra ultrapassa a CIM (128 µg/ml) deste antibiótico, e para este isolado, a utilização deste colírio poderia não ter efeito clinicamente.

A concentração média dos antibióticos na lágrima pode variar. No caso de ciprofloxacina (solução oftálmica a 0,3%) na lágrima após 4 horas da instilação, a concentração chega a ser 16 µg/ml em seres humanos³¹ e em cavalos³², esse valor pode ser ainda maior neste mesmo período (36,25 µg/ml). Tendo em vista que a CIM das cepas testadas neste estudo não ultrapassou 12 µg/ml, a concentração desta droga na lágrima até quatro horas ainda é mais alta, portanto,

uma instilação de colírio com este princípio ativo é efetivo se feito a cada quatro horas.

Já para tobramicina, um trabalho³³ mostrou que a concentração desta droga na lágrima em seres humanos, após 4 horas da instilação, mantém uma concentração média de 8 µg/ml. Portanto, essa concentração ainda assim seria eficaz contra a maioria das cepas testadas neste estudo (moda: 1,00 µg/ml). No entanto, três cepas obtiveram uma CIM preocupante (concentrações de 9, 48 e 128 µg/ml), e caso este colírio fosse usado, a CIM não seria atingida para estes isolados e provavelmente não haveria uma boa resposta *in vivo*. Portanto, frente a uma infecção ocular por *P. aeruginosa* recomenda-se diminuir o intervalo de instilação de colírios de tobramicina de quatro para aproximadamente a cada duas horas.

Concluindo, é essencial que a CIM da droga a ser obtida no local da infecção seja alta. A avaliação da suscetibilidade de *P. aeruginosa* é normalmente feita com referência às concentrações dos níveis séricos. No entanto, as concentrações dos antibióticos obtidas na superfície ocular pela aplicação local de colírios ou pomadas são mais elevadas, por isso faz importante o conhecimento da CIM para melhor avaliar a susceptibilidade antimicrobiana destas cepas oriundas de infecções oculares.

5.7 REFERÊNCIAS

1. QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; MARTER, G.R. 1994. *Pseudomonas* species, p.237-242. In: Ibid.(Eds), Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe, London.
2. LEDBETTER, E.G. ; MUN, J.J. ; KOWBEL, D. ; FLEISZIG, S.M.J. Pathogenic phenotype and genotype of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from spontaneous canine ocular infections. Investig Ophthalmol Visual Sci, Feb, 2009, vol50, n°2.
3. MOORE, C.P.; NAISSE, M.P. Clinical Microbiology. In : GELLAT, K.N. Veterinary Ophthalmology, 3ªEd, 1999.
4. CARTER, G.R.Pseudomonas. In CARTER, G.R.: Fundamentos em Bacteriologia e Micologia Veterinária, 1ed, Ed Roca, São Paulo, 1988.
5. GUTIERREZ, E.H.. Bacterial infections of the eye. P.69-70. In: D.Locatcher-Khorazo and B.C. Seegal.(ed), Microbiology of the eye. The C.V. Mosby Co., St. Louis, 1972.
6. MOORE CP, COLLINS, B.K.; FALES, W.H. Antibacterial susceptibility patterns for microbial isolates associated with infectious keratitis in horses: 63 cases (1986-1994). J Am Vet Med Assoc. 1995 Oct 1;207(7):928-33.
7. MAYO, M.S.; COOK, W.L.; SCHLITZER, R.L.; WARD, M.A.; WILSON, L.A.; AHEARN,D.G. Antibigrams, serotypes, and plasmid profile of *Pseudomonas aeruginosa* associated with corneal ulcers and contact lens wear. J Clin Microbiol, vol24, n°3, 372-376p, 1986.
8. ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. J Antimicro Chemoth 48 (Suppl. 1):5-16, (2001).
9. CDC. Adresseing the problem of antimicrobial resitance. National Center for Infectious Disease. *Target Area Booklet*: 2002. p1-7.
10. CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão; 8ed., V. 23 N1, 2003, Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf. Acesso: 16 de Fevereiro de 2011.
11. CAPOOR MR, NAIR D, DEB M, HASAN A, AGGARWAL P. A simple modification of minimum inhibitory concentration determination by E-test in the clinical laboratory. Indian J Med Microbiol 2006;24:301
12. LIN, C.T.; PETERSEN-JONES, S.M. Antibiotic susceptibility of bacteria isolated from cats with ulcerative keratitis in Taiwan. J Small Anim Pract 49(2):80-83, 2008.
13. LIN, C.T.;PETERSEN-JONES, S. M.. Antibiotic susceptibility of bacterial isolates from corneal ulcers of dogs in Taiwan. J Small Anim Pract , May;48(5):271-4. 2007.
14. TOLAR EL, HENDRIX DV, ROHRBACH BW, et al. Evaluation of clinical characteristics and bacterial isolates in dogs with bacterial keratitis: 97 cases (1993–2003). J Am Vet Med Assoc 2006;228:80–85.

15. LEDBETTER, E.C.; HENDRICKS, L.M.; RIIS, R.C.; SCARLETT, J. In vitro fluoroquinolone susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs with ulcerative keratitis Am J Vet Res June 2007, Vol. 68, No. 6, Pages 638-642.
16. KOWALSKI RP, DHALIWAL DK, KARENCHAK LM, et al. Gatifloxacin and moxifloxacin: an in vitro susceptibility comparison to levofloxacin, ciprofloxacin, and ofloxacin using bacterial keratitis isolates. Am J Ophthalmol 2003;136:500–505.
17. HARIHARAN, H.; MCPHEE, L.; HEANEY, S.; BRYENTON, J. Antimicrobial drug susceptibility of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* . Can Vet J vol 36, march 1995. 166-168p.
18. VARGES, R.; PENNA, B.; MARTINS, G.; MARTINS, R.; LILENBAUM, W.. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* isolated from naturally occurring canine external ocular diseases. Vet Ophthalmol, (2009) 12, 4, 216-220
19. LIMA FILHO, A.A.S., BATISTUZZO, J.A.O. Formulações Magistrais em oftalmologia, Cultura Médica, Rio de Janeiro, Brasil, 2006.
20. DOWLING, P. M.; GRAHN, B.H. Can Antimicrobial therapy of ocular infections. Vet J Volume 122 39, February 1998 121-124p.
21. DUVALL, & KERSHNER, Ophthalmic Medications and Pharmacology, Chap 10 – Anit-Infecctives. Slack Incorporated, New Jersey, USA. 1998
22. RITTER, J.M.; LEWIS, L.D.; MANT, T.G.K.. Clinical Pharmacology, 3rd ed, London, 1981.
23. DUMRE, S.P.; MALLA, S.; SHAKYA, G.; ACHARYA, D.; UPADHYAY, B.P.; GHIMIRE, G.R.; KANSAKAR, P.; ADHIKARI, N. Bacterial etiology and antimicrobial susceptibility pattern of ophthalmic infections in Nepal. J Nepal Assoc Med Lab Sci. JNAMLS, vol9, n°1, Dec, 2008. 31-35p.
24. STEGEMANN, M.R.; PASSMORE, C.A.; SHERINGTON, J.; LINDEMAN, C.J.; PAPP, G.; WEIGEL, D.J.; SKOGERBOE, T.L.. Antimicrobial activity and spectrum of cefovecin, a new extended-spectrum cephalosporin, against pathogens collected from dogs and cats in Europe and North America. et al, 2006), Antimicrob Agents Chemother, July, 2006, vol.50, n.7; p.2286-2292
25. SADER, H.S.; MENDES, R.E.; GALES, A.C.; JONES, R.N.; PFALLER, M.A. ZOCCOLI, C.; SAMPAIO, J. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas do trato respiratório de pacientes com pneumonia internados em hospitais brasileiros: resultados do programa SENTRY, 1997 e 1998. J Pneu mol, 27, 2, 5967p., 2001.
26. BERTONE, J.; HORSPOOL, L. J. I. Equine clinical pharmacology Saunders, Elsevier, 2004, Philadelphia, USA.
27. GOKHALE, N. S. Medical management approach to infectious keratitis Indian J Ophthalmol. 2008 May–Jun; 56(3): 215–220.
28. KOHLER, T.; MENNO, K.; MEHRI MICHEA-HAMZEHPOUR,¹ PLESIAT, P.; NAOMASA, G., TAKESHI, N., LASTA K.C., PECHERE, J.C.. Multidrug efflux in intrinsic resistance to

- trimethoprim and sulfamethoxazole in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:2288-90
29. VIANA, F.A.B. Guia terapêutico veterinário. 2ed., Editora CEM, Lagoa Santa, 2007.
30. PEIFFER, R.L.; STOWE, C.M. Veterinary ophthalmic pharmacology. In Gelatt, K.N., ed. *Veterinary Ophthalmology*. 2nd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1981:160-205.
31. LIMBERG, M.; BUGGÉ, C. Tear concentrations of topically applied ciprofloxacin. *Cornea*. 1994 Nov;13(6):496-9.
32. HENDRIX, D.V.H.; STUFFLE, J.L.; COX, S.K. Pharmacokinetics of topically applied ciprofloxacin in equine tears. *Vet Ophthalmol*, 10, 6, 344-347p., 2007.
33. TANG-LIU, D.D.S.; SCHOB, D.L.; USANSKY, J.; GORDON, Y.J. Comparative tear concentrations over time of ofloxacin and tobramycin in human eyes. *Clin Pharmacol therapeutics*, v.55, n°3, 284-293p, 1994.

ANEXO I

1. Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, UFPR, 2010.



ANEXO I Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Agrárias
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA SCA

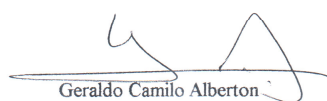
CERTIFICADO


Certificamos que o protocolo no. 040/2010, referente ao projeto “Estudo da microbiota de conjuntiva normal e patológica em animais domésticos e selvagens”, sob a responsabilidade de Lucianne Leigue dos Santos, na forma que foi apresentado, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 13 de Setembro de 2010. Este certificado expira em 13 de agosto de 2011.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 040/2010, regarding the project “Bacterial microbiota of normal and pathologic eyes surfaces in domestic and exotic animals”, in charge of Lucianne Leigue dos Santos, in the terms it was presented, was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Paraná, Southern Brazil) during session on September 2010. This certificate expires on September, 2011.

Curitiba, 13 de Setembro de 2010.


Geraldo Camilo Alberton
Presidente


Patrick Schmidt
Vice-Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais
Setor de Ciências Agrárias
Universidade Federal do Paraná.

ANEXO II

2. Primeira folha do artigo de revisão "A superfície ocular e a sua microbiota" publicado em: MEDVEP, Revista Científica de Medicina Veterinária de Pequenos Animais e Animais de Estimação, v. 8, p. 467-473, 2010.

literature

ANEXO II

A superfície ocular e a sua microbiota

The eye surface and its microbiota

Julianne Leique dos Santos – Especialista, Pós-graduação UFRP; Email: julianne.leique@ufpr.br
 Eliene Montanari-Ferreira – Prof. UFRP Universidade Federal do Paraná – Campus Agrárias
 ran Roque de Barros – Prof. UFRP Universidade Federal do Paraná – Campus Agrárias
 Universidade Federal do Paraná – Campus Agrárias

doi:10.11606/ISSN1981-1301.MEDVEP - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação 2010; 8(28): 467-473.

Resumo

Microorganismos frequentemente encontrados em vários locais da superfície corpórea de indivíduos normais e saudáveis são descritos como microbiota indígena. A superfície ocular é rica em nutrientes e, consequentemente, muitas bactérias são encontradas, as quais constituem a microbiota ocular comensal. O conhecimento da microbiota normal auxilia o clínico a avaliar melhor certos microrganismos potencialmente patogênicos na superfície ocular e, em casos de lesões oculares, particularmente úlceras de córnea, iniciar medidas preventivas e terapêuticas com maior efetividade. A proposta desta revisão é ajudar a esclarecer a dinâmica interação que existe entre a superfície ocular e a sua microbiota indígena.

Palavras-chave: bactérias, olho, colonização ocular, oftalmologia

Abstract

The microorganisms that are frequently found in various body sites in normal, healthy individuals are described as indigenous microbiota. The eye surface is rich in nutrients and, consequently, several bacteria are often found, which constitute the commensal ocular microbiota. Knowledge of normal ocular microbiota enables the clinician to evaluate the pathogenic potential of certain organisms on the ocular surface and, in the event of ocular lesions, especially in corneal ulcer, to initiate preventive and therapeutic measures with greater efficiency. The purpose of this review is help to clarify this dynamic interaction between eye surface and its indigenous microbiota.

Key-words: bacteria, eye, ocular colonization, ophthalmology

ANEXO III

3. Primeira folha do artigo publicado com dados desta dissertação (Capítulo 4, microbiota ocular de animais domésticos e silvestres) "The chinchilla eye: morphologic observations, echobiometric findings and reference values for selected ophthalmic diagnostic tests". Veterinary Ophthalmology, v. 13, p. 14-25, 2010.

Veterinary Ophthalmology (2010) 13, Supplement 1, 14-25

The chinchilla eye: morphologic observations, echobiometric findings and reference values for selected ophthalmic diagnostic tests

Leandro Lima,* Fabiano Montiani-Ferreira,*†,‡ Mariana Tramontin,* Lucianne Leigue dos Santos,* Marcello Machado,‡,§ Rogério Ribas Lange* and Heloisa Helena Abil Russ¶

*Universidade Federal do Paraná (UFPR), Departamento de Medicina Veterinária, Rua do Funcionário, 1560, 80035-080, Curitiba - PR, Brazil;

†Michigan State University, Department of Small Animal Clinical Sciences, D-208, Veterinary Medical Center, 48824-1314 East Lansing, MI, USA;

‡Universidade do Contestado (UnC) Campus de Concórdia - Rua Visconde Siqueira, 3000, 89700-000, Concórdia - SC, Brazil; §FMVZ/USP - Setor de Anatomia Animal, Departamento de Cirurgia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, 05508-270 - Cidade Universitária, São Paulo - SP - Brazil; and ¶Faculdade Evangélica de Medicina de Curitiba, Rua Professor Rua Sapienti, 690, 80810-120, Curitiba - PR, Brazil

Address communications to:

Dr. F. Montiani-Ferreira

Tel.: 55 41 9969-8983

Fax: 55 41 9969-8983

e-mail: montiani@ufpr.br;

ferreira9@cm.msu.edu

Abstract

Purpose To carry out a descriptive investigation into the most relevant morphological features of the chinchilla eye and bony orbit, as well as to perform selected ophthalmic diagnostic tests with the aim of establishing normal anatomic and physiologic references for this species.

Method A total of 57 healthy, chinchillas were used to test most of the parameters in this investigation. Besides morphologic observations of the globe and adnexa, selected ocular tests and parameters were investigated, including blink frequency, palpebral fissure length (PFL), Schirmer tear test (STT), esthesiometry, intraocular pressure (IOP), central corneal thickness (CCT), B-mode echobiometric measurements of the globe and culture of the normal conjunctival bacterial microbiota. Morphologic observations were made using six formalin-fixed globes and four macerated skulls. **Results and Discussion** Normal parameters found for selected ocular diagnostic tests were: blink frequency: 2.6 ± 0.84 blinks per 10 min; STT: 1.07 ± 0.54 mm; esthesiometry: 1.24 ± 0.46 cm; IOP: 17.71 ± 4.17 mmHg; CCT: 0.34 ± 0.03 mm; PFL: 1.44 ± 0.11 cm; anterior chamber depth: 2.01 ± 0.2 mm; axial lens thickness: 5.49 ± 0.43 mm; vitreous chamber depth (internal): 3.69 ± 0.52 mm; axial globe length: 1.14 ± 0.07 cm. The most frequent bacteria isolated from the conjunctiva were *Streptococcus* sp. (27.45%), *Staphylococcus aureus* (23.52%) and coagulase-negative *Staphylococcus* (19.60%). No statistically significant differences between left or right eyes or genders were found for any of the results. Reference data and morphologic observations obtained in this investigation will help veterinary ophthalmologists to recognize unique morphological features and more accurately diagnose ocular diseases in the chinchilla, an animal already being used as a biological model for ophthalmic studies.

Key Words: *Chinchilla lanigera*, esthesiometry, intraocular pressure, morphology, normal microflora, ultrasonic pachymetry, ultrasonography

INTRODUCTION

The term chinchilla is a generic one that refers indistinctly to two species of hystricomorph rodents closely related to

guinea pigs: the short-tailed chinchilla *Chinchilla brevicaudata*, and the long-tailed or *Chinchilla lanigera*. Chinchillas occur naturally only in South America (Argentina, Bolivia, Chile and possibly Peru). These animals were once widely

VITA

LUCIANNE LEIGUE DOS SANTOS – nascida em 18 de maio de 1983 em Curitiba, Paraná, Brasil, possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Paraná – *Campus* Curitiba (UFPR), Especialização em Microbiologia pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR), Especialização em Biotecnologia e Biologia Molecular Aplicados a Agroindústria pela Universidade Federal do Paraná – *Campus* Palotina e Mestrado em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Paraná - Curitiba. Foi professora substituta por dois anos na Universidade Federal do Paraná - Palotina, ministrando a Disciplina de Microbiologia Veterinária. Atualmente foi aprovada como professora colaboradora na Universidade do Centro-Oeste do Paraná (UNICENTRO) para ministrar as Disciplinas de Microbiologia Veterinária e a Disciplina de Saúde Pública Veterinária.